©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen mit leeren und vollen Zellsäften

Von Elfriede Huber

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 13 Abbildungen auf 3 Tafeln

(Vorgelegt in der Sitzung am 22. November 1955)

I. Einleitung.

Eine der auffälligsten und am meisten studierten Erscheinungen im weiten Felde der botanischen Vitalfärbung ist die Farbstoffspeicherung in Zellsäften aus alkalischen Lösungen basischer Farbstoffe. Nachdem eine Reihe von Vorläufern (Bethe 1905, 1922, Rhode 1917) auf die Wichtigkeit des p_H-Wertes der Farblösung für den Speicherort in der Zelle hingewiesen hatten, war es vor allem Strugger (1936 u. f.), der die fraglichen Phänomene eingehend analysierte. Drawert (1940 u. f.) fügte die Analyse des physikochemischen Verhaltens der Farbstoffe selbst hinzu und konnte so die wichtige Beobachtung Struggers aufklären, daß z. B. Neutralrot nur dann in der Vakuole gespeichert wird, wenn der p_H-Wert der Farblösung größer als 7 ist: Der Farbstoff liegt hier in Form der elektroneutralen Farbbase vor, die auf Grund ihrer guten Lipoidlöslichkeit das lebende Plasma leicht zu durchdringen vermag.

Höfler (1947—1949) machte darauf aufmerksam, daß nicht alle Zellsäfte mit Hilfe des gleichen Mechanismus speichern. Er unterschied zwischen „vollen" und „leeren" Zellsäften, die sich nach Vitalfärbung schon für den bloßen Augenschein durch verschiedene Farbtöne zu erkennen geben. So etwa fluoreszieren nach Aufnahme von Akridinorange die leeren Zellsäfte rot, die vollen grün.

Wiesner (1951) führte ähnliche Unterscheidungen auch mit Hellfeldfarbstoffen durch.

Die Art der Farbstoffspeicherung in vollen und leeren Zellsäften ist ganz verschieden. Die Ausdrücke „voll" und „leer" gehen auf die in vielen Versuchen erhärtete Annahme zurück, daß die vollen Zellsäfte bestimmte „Speicherstoffe" von zumeist noch unbe-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kannter Natur enthalten, die den Farbstoff chemisch binden. (Härtel 1951, wies darauf hin, daß in gewissen Fällen Gerbstoffe den „vollen" Charakter eines Zellsaftes bestimmen können.) Bei leeren Zellsäften, die speicherstofffrei sind, werden hingegen die undissoziierten lipoidlöslichen Moleküle, die leicht durch das Plasma eindringen, in den sauren Zellsäften zu Ionen umgebildet, welche an das wässerige Medium gebunden sind und so nicht wieder am Lipoidwege durch das Plasma exosmieren können. Dadurch kommt es zu einer starken Anreicherung des Farbstoffes im Zellsaft.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist durch die Tatsache gegeben, daß die leeren Zellsäfte nach Behandlung mit NH_3 entfärbt werden. Die mit Hilfe des „Ionenfallenmechanismus" gefärbten leeren Zellsäfte werden durch das NH_3 reversibel alkalisch. Die nun umgewandelten permeierfähigen Moleküle vermögen in diesem Zustand rasch aus der Zelle auszutreten. Volle Zellsäfte hingegen halten den Farbstoff auch in NH_3 fest.

Zu den beliebtesten Vitalfärbeobjekten zählen die Süßwasseralgen (vgl. Cholnoky und Höfler 1950, Höfler und Schindler 1951, 1953, Loub 1951, Hirn 1953 a, b, Kiermayer 1954, 1955). In jüngster Zeit haben Höfler und Schindler (1955) in ihrer Arbeit: „Volle und leere Zellsäfte bei Algen" weitere wichtige Ergebnisse ihrer Forschungen auf dem Gebiet der Vitalfärbung gebracht. Ein Ziel war, die Untersuchungen über die Farbspeicherung voller und leerer Zellsäfte auf weitere Süßwasseralgen auszudehnen. Als Hauptunterscheidungsmerkmale gelten:

1. Die Erscheinungen der Metachromasie.
2. Die NH_3-Reaktionen.
3. Die parallele Färbung mit dem im physiologischen p_H-Bereich nicht ionisierbaren Rhodamin B und dissoziierenden basischen Farbstoffen.
4. Die Lage der Färbeschwellen in p_H-gestuften Farbbadreihen.
5. Die Allgemeinkontraktion der Vakuolen.

Nach den Untersuchungen, die nach diesen Gesichtspunkten durchgeführt wurden, war die Entscheidung über volle oder leere Zellsäfte zumeist klar zu treffen. Höfler und Schindler betonten, daß leere Zellsäfte bei Algen viel verbreiteter sind als bei Gewebszellen höherer Pflanzen.

Zu den von Höfler und Schindler untersuchten Farbstoffen zog ich noch Methylenblau zu meinen Untersuchungen heran. Außerdem wurde bei längerer Einwirkungsdauer des Farbstoffes eine Verschiebung der Färbeschwellen gegen den sauren Bereich hin beobachtet.

II. Material und Methodik.

Das Material stammt hauptsächlich aus der Ramsau bei Schladming am Südfuße des Dachsteins aus den Hochmooren RMK und RT[1] (vgl. Höfler und Schindler 1951 und Höfler 1953). Weiters stand mir artenreiches Material aus Tamsweg zur Verfügung, das von Dr. W. Url gesammelt worden ist. Das Lunzer Material wurde von Frl. cand. phil. E. Fetzmann im Herbst 1953 nach Wien gebracht. Im Herbst 1954 brachten Dr. W. Url und Dr. W. Loub von einer Exkursion nach Vorarlberg schöne Algenproben ein. Ferner wurden Institutsexkursionen nach Moosbrunn und Stockerau unternommen, wo wertvolles Algenmaterial aufgesammelt wurde. Ich selbst machte einige Exkursionen in Kärnten nach St. Lorenzen, Ebene Reichenau, Gogausee und Längsee. Auch vom Neusiedler See (Lange Lacke) wurde Material verwendet. Von der näheren Umgebung von Wien wurden vor allem Algen vom Wasserpark in Wien-Floridsdorf, von Mödling bei Wien und vom Roten Berg in Wien zur Untersuchung herangezogen.

Die Färbungen wurden nach den üblichen Färbemethoden (vgl. Cholnoky und Höfler 1950 und Höfler und Schindler 1951) durchgeführt. Es wurde jeweils ein Tropfen des Algenmaterials auf den Objektträger gebracht, das Standortwasser gut abgesaugt und sogleich ein Tropfen der verdünnten Farblösung zugesetzt. Mit einer sehr feinen Glasnadel wurde das Material gut verteilt, hernach wurde das Deckglas aufgelegt. Nach abgelaufener Färbezeit (meist zehn Minuten) wurde die entsprechende Pufferlösung bzw. Leitungswasser durchgesaugt. Bei Langfärbungsversuchen wurde jedoch die Färbung nicht auf dem Objektträger durchgeführt, sondern in kleinen Glasröhrchen. In diese gab ich jeweils eine gewisse Menge der verschiedenartig gepufferten Farblösung und eine Probe des Materials. Auch hier wurden durch Schütteln die Algen in der Farblösung gut verteilt. So wird das Verdunsten des Farbstoffes weitgehendst hintangehalten, außerdem ist das quantitative Verhältnis zwischen Farbstoff und Material viel günstiger, und es kann der Farbstoff ungehindert in jede Zelle eindringen. Nach abgelaufenen Färbezeiten wurde je eine Probe des gefärbten Algenmaterials mit einer dünnen Pipette den Röhrchen entnommen, auf den Objektträger gebracht, mit einem Deckglas bedeckt und unter dem Mikroskop beobachtet.

Zu den Versuchen gebrauchte ich zumeist die blauen Farbstoffe Toluidinblau („Bayer" Leverkusen; stand. 551 481) und Brillantcresylblau (von diesem wurden zwei Präparate verwendet: E. Merck, Darmstadt 1280, und von Dr. G. Grübler und Co., Leipzig). Diese Farbstoffe waren immer 1 : 10.000 verdünnt. Neutralrot von Dr. G. Grübler und Co., Leipzig und Neutralrot von E. Merck, Darmstadt („Indikatoren zur p_H-Bestimmung 1369"), wurden in verschiedenen Konzentrationen angewandt (1 : 1000 bis 1 : 100.000). Ebenso wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Akridinorange und Rhodamin B (meist in der Konzentration 1 : 10.000) zu den Färbungsversuchen herangezogen.

Die Pufferlösungen wurden wie üblich mit primärem Kaliumphosphat und tertiärem Natriumphosphat hergestellt (vgl. Strugger 1938, 1949 und Kinzel 1953). Die p_H-Werte 4,6 bis 11,0 wurden von Herrn Dr. Kinzel mit dem Lautenschläger-Ionometer überprüft. Die Mischungsverhältnisse der Stammlösungen zu den p_H-Werten 11,6, 12,2 und 12,5 wurden von

[1] RMK = Ramsauer Moor beim Karlwirt, RT = Ramsauer Torfmoor.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Strugger übernommen. Die Plasmolyse wurde meist mit Traubenzuckerlösung (0,7—1,0 mol) durchgeführt.

Die Farbangaben sind nach Ostwalds „Kleinen Farbmeßtafeln" (Ausgabe C) festgelegt.

III. Versuche mit basischen Farbstoffen.

In den einleitenden Untersuchungen trachtete ich vor allem, das Verhalten verschiedener Süßwasseralgen bei Vitalfärbung mit einigen Farbstoffen kennenzulernen. Um einen gewissen Überblick über die Färbeergebnisse einzelner Farbstoffe auf „volle" und „leere" und gerbstoffhaltige Zellen zu bekommen, habe ich jeder Gruppe ein charakteristisches Beispiel entnommen und in einer Tabelle zusammengefaßt (vgl. Tabelle 2).

Als Vertreter für volle Zellsäfte fungiert *Netrium digitus*. *Zygogonium* sp., das einige Besonderheiten zeigt, wird zum Vergleich angeführt (vgl. Tabelle 2). Charakteristisch für leere Zell-

Tabelle 1.

a) Volle Zellsäfte:

Farbstoff	Neutralrot	Toluidinblau	Methylenblau	Brillantcresylblau	Rhodamin B	$+NH_3$ n/100
p_H	7,5	11,2	11,2	11,2	(Hellfeld)	
Objekte						
Netrium digitus	violette Tröpfchen	blaue Tröpfchenspeicherung			violette Tröpfchen	— —
Cylindrocystis Brebissonii	violette Tröpfchen	grünblaue Tröpfchen			violette Tröpfchen	— —
Micrasterias fimbriata	violette Vakuolen	blaue Vakuolenfärbung			violette Vakuolen	— —
Spirogyra sp.	violette Krümel, violette Vakuolen	blaugrüne Krümelfällung blaue Vakuolen			violette Krümel, violette Vakuolen	— —
Zygogonium sp. (?)	violette Vakuolen	blaue Tröpfchen			ungefärbt	— +
		violette Vakuolen				

Erklärung zu Tabelle 1:

— — Die Zellsäfte entfärben sich nicht.

— + Die Diffusfärbung verschwindet, jedoch die Tröpfchen nicht entfärbt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

b) Leere Zellsäfte zeigten:

Micrasterias truncata
Micrasterias americana
Micrasterias denticulata
Micrasterias papillifera
Micrasterias apiculata
Arthrodesmus convergens
Cosmarium conspersum
Cosmarium amoenum
Desmidium Swartzii
Netrium interruptum
Tetmemorus granulatus
Tetmemorus Brebissonii
Xanthidium cristatum
Euastrum binale
Euastrum affine
Euastrum didelta
Euastrum verrucosum
Euastrum oblongum
Euastrum insigne
Eremosphaera viridis
Staurastrum paradoxum
Staurastrum teliferum
Staurastrum scabrum
Pleurotaenium nodulosum
Pinnularia viridis
Diatoma vulgaris
Closterium cynthia
Closterium lunula
Closterium libellula
Closterium acutum
Closterium insigne
Navicula oblonga
Mougeotia sp. (?)
Oedogonium sp. (?)
Hyalotheca dissiliens (?)
Hyalotheca mucosa (?)
Gymnozyga Brebissonii (?)

säfte ist *Micrasterias americana,* als zweiten Vertreter wählte ich *Gymnozyga Brebissonii* (vgl. Tabelle 2). Von den gerbstoffhaltigen Zellen hat *Spirogyra majuscula* volle, *Mougeotia* sp. leere Zellsäfte (vgl. Tabelle 2/I. S. 914/915).

Es wurden die Farbstoffe Neutralrot, Rhodamin B (Hellfeld), Toluidinblau, Brillantcresylblau und Methylenblau, durchwegs in der Konzentration 1 10.000, verwendet. In Klammern wurden die Farbtonnummern nach Ostwald hinzugefügt. Schließlich gibt die letzte Spalte noch das Verhalten der gefärbten Zellen mit n/100 NH_3 an.

Weiter war dann die Untersuchung auf zahlreiche Objekte auszudehnen.

Die vorstehende Tabelle 1 soll eine kurze Übersicht über die Verteilung von „vollen" und „leeren" Zellsäften bei den untersuchten Algen geben. In den einzelnen Spalten sind Angaben über die Färbung ihrer Zellsäfte mit verschiedenen Farbstoffen im alkalischen Bereich angegeben. Bei denjenigen Arten, die mit einem Fragezeichen versehen sind, war mir die Entscheidung, ob voll oder leer, nicht möglich.

In dem nachstehenden Kapitel soll nun das Vitalfärbeverhalten gegenüber den verschiedenen Farbstoffen näher besprochen werden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Neutralrot.

Der basische Farbstoff Neutralrot wird seit langem zur Vitalfärbung von Pflanzenzellen angewandt (Küster 1928, Strugger 1935, 1936, Gicklhorn 1929, Cholnoky und Höfler 1950, Kiermayer 1954 und Höfler und Schindler 1955). Der Farbstoff ist vor allem wegen seiner Unschädlichkeit auf die Zellen sehr geschätzt. Es ist sogar gelungen, mit Neutralrot gefärbte Zellen von Hefe und Pilzen (vgl. Guilliermond 1930, Guilliermond-Atkinson 1941) weiterzukultivieren, sie waren weder in ihrem Wachstum noch in ihrer Vermehrung gehemmt. Seit Höfler (1947—1949) und Wiesner (1951) ist bekannt, daß mit Neutralrot auch eine Unterscheidung zwischen „vollen" und „leeren" Zellsäften im Sinne von Höfler (1949) möglich ist, da letztere diffus erdbeerrot gefärbt werden und einem Farbton von ungefähr la 6 entsprechen. Dagegen werden die „vollen" Zellsäfte violett tingiert und entsprechen der Farbtonnummer nc 10.

Neutralrot hat seinen Umschlagspunkt um $p_H = 7{,}4$. Unterhalb dieser Halbwertsstufe färben sich im sauren Bereich alle Zellwände rosa (Farbton ia 8 nach Ostwald). Allerdings sah ich bei 15 Minuten langer Färbung mit Neutralrot 1 10.000, $p_H = 4{,}6$ bei einigen Versuchsobjekten neben der Zellwandfärbung auch Anreicherungen des Farbstoffes im Zellinneren. So hatte z. B. *Netrium digitus* rot gefärbte Zellwände, in den Zellen waren zahlreiche violette Tröpfchen sichtbar. Auch *Cylindrocystis Brebissonii* war diffus weinrot gefärbt, im Plasma erschienen viele violette Tröpfchen. Es handelt sich also bei den auch noch im sauren Bereich färbbaren Zellsäften um volle Zellsäfte. Auch Höfler und Schindler (1955) halten die Farbspeicherung der Zellsäfte aus sauren Lösungen für ein Mittel zur Erkennung voller Zellsäfte.

Im neutralen und alkalischen Bereich sind die Zellwände durchwegs ungefärbt. Nur die Querwände von verschiedenen Fadenalgen, wie *Gymnozyga Brebissonii*, *Mougeotia* sp., *Oedogonium* sp., reichern den Farbstoff noch im alkalischen Bereich an.

Wie schon oben erwähnt, zeigen die leeren Zellsäfte rote Vakuolenfärbung (vgl. Cholnoky und Höfler 1950). Die meisten *Desmidiaceae* haben leere Zellsäfte (vgl. Tabelle 1). Der Zellsaft färbt sich zuerst schwach rosa (ia 8) diffus, der Farbton wird jedoch bald intensiver, die Vakuolen nehmen eine blutrote (ungefähr na 6) Färbung an und kontrahieren sich zumeist stark. Oft zerfallen die Vakuolen in mehrere Teilvakuolen. Das folgende Versuchsprotokoll soll über das Verhalten einiger *Desmidiaceae* und *Diatomeae* zu Neutralrot Aufschluß geben.

Material: Kärnten, Ebene Reichenau.
Farbstoff: Neutralrot, 1 : 10.000, $p_H = 7{,}1$.
Färbezeit: 10 Minuten.
Diatoma vulgaris: Rote Vakuolenfärbung, in den Zellen mehrere Entmischungstropfen ausgefallen. Membran ungefärbt.

 ©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Farbstoff	Neutralrot		Rhodamin B (Hellfeld)	Toluidinblau		Brillantcresylblau		Methylenblau		nach Zusatz von n/100 NH_3
p_H um	4,6	7,1 7,5 Leitungsw.		7,5	10,5 11,6 12,5	7,5	10,5 11,6 12,5	7,5	10,5 11,6 12,5	
I. *Spirogyra majuscula*	Zellwand rosa (ia 8)	Violette (la 10) Diffusfärbung, starke violette Krümelspeicherung	Hellrosa (ea 3) bis violette (ia 11) Diffusfärbung. Zellwand ungefärbt	Zellwand blau gefärbt (ne 13)	Blaue Diffusfärbung, blaugrüne (na 16) Gerbstoffällung	Blaue Zellwandfärbung (ne 13)	Vakuolenfärbung anfangs hellblau, später dunkelblau (nc 14)	Blaue (ne 13) Zellwandfärbung	Vakuole diffus hellblau (la 14), dunklere (pe 14) Tröpfchen	Die Diffusfärbung bleibt erhalten
Mougeotia sp.	Zellwand hellrosa	Rotviolette Diffusfärbung, violette (nc 10) Gerbstoffällung	Schwach violette (ia 10) Diffusfärbung, lila (pa 11) Gerbstoffällung	Zellwand blauviolett	Violette (la 11) Diffusfärbung, blaugrüne (na 16) Gerbstoffällung	Blaue Zellwandfärbung	Zellsaft diffus violett (na 12), grünblaue Gerbstoffällung (na 16)	Blaue Zellwände	Hellblaue, manchmal auch violette Diffusfärbung, hell- bis blaugrüne Gerbstoffällung	Zellsaft entfärbt
II. *Micrasterias americana*	Zellwand hellrosa	Erdbeerrote (la 6) Vakuolenfärbung	Farbstoff nicht angereichert	Zellwand hellblau	Violette (la 12) Teilvakuolen	Blaue Zellwandfärbung	Violette (la 12) Teilvakuolen	Blaue Zellwände	Violette Zellsaftfärbung. Bis p_H 12,2 noch blaue Zellwandfärbung	Zellsaft entfärbt
Gymnozyga Brebissonii	Zellwand rosa (ia 8)	Erdbeerrote (la 6) Vakuolenfärbung. Längswände ungefärbt, Querwände violett gefärbt	Farbstoff wird nicht angereichert	Querw. fast schwarz erscheinend, Längsw. blau (nc 14)	Violette (la 12) Vakuolenfärbung	Querw. dunkelblau, Längsw. blau	Violette (la 12) Vakuolenfärbung	Längsw. blau gefärbt, Querw. violett	Violette (la 11) Vakuolenfärbung, etwas dunklere blauviolette Querwände	Zellsaft entfärbt
III. *Netrium digitus*	Rosa Zellwandfärbung	Sehr zahlreiche violette Tröpfchen (nc 10)	Violette Tröpfchenspeicherung	Blaue (lc 13) Zellwandfärbung	Dunkelblaue (pg 13) Tröpfchenfällung	Blaue Zellwandfärbung	Dunkelblaue Tröpfchen	Blaue (ne 13) Zellwände	Dunkelblaue Tröpfchen	Zellsaft nicht entfärbt
Zygogonium sp.	Dunkelrosa Zellwandfärbung	Rot bis violette Vakuolenfärbung	Nicht oder fast gar nicht gefärbt erscheinend	Zellwand blauviolett	Violette (ia 11) Diffusfärbung, dunkelblaue (pg 13) Tröpfchen	Blaue Zellwandfärbung	Blaue (nc 14), manchmal auch violette (ia 11) Vakuolenfärbung	Blaue Zellwandfärbung	Diffuse blaue (ne 14) Vakuolenfärbung	Zellsaft nicht entfärbt

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Pinnularia viridis: Leichte Diffusfärbung des Zellsaftraumes. Starke Vakuolenkontraktion, viele kleine dunkelrote Tröpfchen, die in lebhafter BMB sind.

Cymbella sp.: Rote Vakuolenfärbung. Kleine rote Entmischungströpfchen.

Navicula oblonga: Rote Entmischungstropfen in den Zellen zu sehen.

Fragilaria sp.: Erdbeerrote Vakuolenfärbung.

Synedra sp.: Rote Vakuolenfärbung.

Die von mir untersuchten *Diatomeen* zeigten also durchwegs leere Zellsäfte, erschienen demnach mit Neutralrot gefärbt im roten (ga 6) Farbton (vgl. Cholnoky und Höfler 1950 und Hirn 1953).

Material: Tamsweg.

Farbstoff: Neutralrot, 1 : 10.000, in Leitungswasser gelöst ($p_H = 7{,}8$).

Färbedauer: 15 Minuten.

Micrasterias rotata: Rosa Diffusfärbung und dunkelviolette Körnchen. Mit n/100 NH_3 verschwindet die Diffusfärbung, die Körnchen jedoch nicht.

Micrasterias denticulata: Erdbeerrote Vakuolenfärbung. Mit n/100 NH_3 verschwindet die Färbung, die Zelle ist jedoch leicht geschädigt, der Protoplast schrumpft.

Micrasterias americana: Rosa Diffusfärbung, rote abgerundete Teilvakuolen (na 7).

Micrasterias truncata: Rosa Diffusfärbung.

Eremosphaera viridis: Erdbeerrote Zellsaftfärbung, fast die ganze Zelle erfüllend. Mit n/100 NH_3 entfärbt.

Euastrum oblongum: Erdbeerrote Vakuolenfärbung. Nach Zusatz von Ammoniak rasche Entfärbung.

Euastrum insigne: Erdbeerrote Vakuolenfärbung. Mit n/100 NH_3 entfärbt.

Netrium digitus: Violette Tröpfchenfällung. Der Zellsaft entfärbt sich mit Ammoniak nicht.

Closterium libellula: Rote dunkle (na 6) abgerundete Tröpfchen, die im ganzen Zellsaftraum verteilt sind. In den Endvakuolen etwas dunkler (na 7) gefärbte Tröpfchen in BMB.

Closterium lunula: Diffus rosa (ia 8) gefärbt.

Closterium acutum: Viele abgerundete rote Teilvakuolen.

Closterium cynthia: Fast gelbrote Diffusfärbung des Zellsaftraumes.

Cosmarium cucurbita: Violette Tröpfchen im Plasma.

Cylindrocystis Breb.: Ebenfalls violette Tröpfchen im Plasma.

Pleurotaenium trabecula: Violette Vakuolenfärbung. Mit n/100 NH_3 nicht entfärbt.

Zygnema sp.: Starke violette Krümelfällung. Keine Diffusfärbung zu sehen.

Die leeren Zellsäfte ließen sich, wie aus meinen Protokollen und aus Tabelle 2 hervorgeht, mit n/100 NH_3 entfärben (vgl. Höfler 1947).

Netrium digitus speichert den Farbstoff immer in Form von violetten Tröpfchen. Ein einziges Mal sah ich eine dunkelviolette Vakuolenfärbung der Zellen, nachdem diese zwei Stunden in der Farblösung waren. Der Raum zwischen Zellwand und Chloroplast war mit dem violett gefärbten Zellsaft erfüllt. Es ist natürlich durchaus möglich, daß es sich um leicht geschädigte Zellen

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

gehandelt hat. Die Zellen waren allerdings mit 0,7 mol TRZ konvex plasmolysierbar.

Auch bei *Zygnema* ist eine Diffusfärbung des Zellsaftes sehr selten (vgl. Höfler und Schindler 1955). Ein einziges Mal konnte ich eine hellviolette Diffusfärbung beobachten. Die Zellfäden waren mit einer Neutralrotlösung (Leitungswasser) 5 Minuten lang gefärbt worden.

Über die schädigende Wirkung des Neutralrot auf *Spirogyra* vgl. Huber (1955).

Akridinorange.

Der Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange wurde von Strugger (1940) eingeführt und ist in jüngerer Zeit oft zur Unterscheidung zwischen vollen und leeren Zellsäften herangezogen worden. Es läßt volle Zellsäfte in einer grünen (Höfler 1947 b, 1949) und leere in einer gleißend kupferroten (Strugger 1940) Fluoreszenzfarbe erscheinen. Letztere ist bei Algen oft nicht gut von der Eigenfluoreszenz der Chloroplasten zu unterscheiden, und es ist dann nötig, die Zellen zu zentrifugieren und dadurch die Plastiden zu verlagern. Doch sind nach Höfler (1946, 1947 a, b und Höfler und Schindler 1955) leere Zellsäfte auch im Hellfeld an ihrer auffälligen sattgelben Färbung zu erkennen. Die Farbionenspeicherung voller Zellsäfte ist im Hellfeldmikroskop fast nicht zu sehen.

Als Versuchsobjekte für alle Zellsäfte dienten *Spirogyra* und *Netrium digitus*. Die *Spirogyren* wurden nach vier Minuten langer Zentrifugierung (2000 Umdrehungen) mit Akridinorange 1 : 10.000 im alkalischen Bereich 10 Minuten lang gefärbt, hernach die entsprechende Pufferlösung durchgesaugt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine starke Krümelspeicherung ließ die Zellen in gleißend kupferroter Färbung erscheinen, ebenso leuchteten die Chloroplasten grellrot. Der Zellsaft war grün gefärbt. Bei *Netrium digitus* fielen, wie bereits bekannt, zahlreiche größere dunkelgrün fluoreszierende Entmischungstropfen aus.

Zellen mit leeren Zellsäften, wie *Gymnozyga Brebissonii, Desmidium Swartzii, Arthrodesmus convergens* und andere wurden meist im Hellfeld betrachtet, wo sie die schon oben beschriebene Gelbfärbung zeigten. *Oedogonium* und *Mougetia* sp. leuchteten im UV-Licht rot. Im Hellfeld trat die sattgelbe Färbung in Erscheinung, während *Mougeotia* im Übersichtsbild eine bräunlichorange Färbung zeigte.

Die Rotfärbung ionenspeichernder Zellsäfte nach Behandlung mit Akridinorange kommt nur in neutralen oder schwach alkalischen Farblösungen zustande (vgl. Strugger 1940, Höfler 1948). Die Grünfluoreszenz voller Zellsäfte hingegen reicht noch in den stark sauren Bereich hinein (vgl. Pecksieder 1950). So waren die Zellsäfte von *Spirogyra* sp. mit Akridinorange

$p_H = 4{,}6$ noch färbbar. Die Zellen ließen sich mit 0,7 mol TRZ normal konvex plasmolysieren.

Rhodamin B.

Als der unschädlichste Vitalfarbstoff gilt Rhodamin B (Strugger 1936/37, 1938, 1939, 1941, 1943, Drawert 1939, 1940, Johannes 1941). Vielfach sind nach Strugger und Johannes Zellen, die mit Rhodamin B gefärbt waren, in ihrer Weiterkultur und Vermehrung nicht gehemmt. Rhodamin B ist ein elektroneutraler Farbstoff. Er liegt im ganzen gebräuchlichen p_H-Bereich in undissoziierter Form vor. Es ist eine diffuse Färbung des Zellsaftes nur dann möglich, wenn der Farbstoff mit zelleigenen Stoffen eine chemische Bindung eingehen kann, wenn also volle Zellsäfte vorliegen. Leere Zellsäfte vermögen den Farbstoff demnach nicht zu speichern, er kann nur im Plasma in seiner Lipoidphase gespeichert werden. Im Hellfeld ist diese Plasmafärbung oft schwer zu erkennen, im UV-Licht fluoresziert sie gelb (vgl. Drawert 1939, 1940, Strugger 1938).

Bekanntlich wird Rhodamin B von der unteren Epidermis von *Allium cepa,* die immer wieder als Beispiel für volle Zellsäfte angeführt wird, diffus violett gespeichert. Wird der Farbstoff stärker angereichert, so entstehen kleine rubinrote Entmischungskugeln, die später meist zu ein oder zwei größeren Kugeln innerhalb einer Zelle zusammenfließen. Ruhende Zellen der oberen Epidermis von *Allium cepa* besitzen leere Zellsäfte. Diese erscheinen nach der Rhodamin-B-Färbung im Hellfeld ungefärbt. Die Plasmafärbung zeigt im UV-Licht hellgelbe Fluoreszenz (vgl. Strugger 1938, Flasch 1955). Ähnliche Erscheinungen zeigen auch die Zellen von Süßwasseralgen, nur volle Zellsäfte können den Farbstoff Rhodamin B diffus speichern (vgl. Höfler 1949 b, Höfler und Schindler 1955).

Auch in meinen Versuchen zeigten leere Zellsäfte bei Behandlung mit Rhodamin B (1 : 5000, 1 : 10.000) nie diffuse Vakuolenfärbung (vgl. Tabelle 2).

Bei *Mougeotia* war einige Male neben der violetten (la 11) Färbung der Gerbstoffbläschen eine Diffusfärbung des Zellsaftes im gleichen Farbton zu beobachten.

Nach 10 Minuten langer Färbung mit diesem Farbstoff ließ sich bei Zellen von *Micrasterias rotata* keine Farbspeicherung nachweisen. *Micrasterias fimbriata* und *Micrasterias denticulata* hingegen zeigten schöne violett gefärbte abgerundete Teilvakuolen, die bei *M. fimbriata* zu kleinen Tröpfchen ausgebildet waren.

Cylindrocystis Brebissonii zeigte eine blauviolette (pa 11), *Cosmarium cucurbita* eine violette Tröpfchenspeicherung (vgl. Hirn 1953, Höfler und Schindler 1955). *Zygnema* war in den Versuchen mit Rhodamin B 1 : 10.000 fast nicht gefärbt, nur schwache Plasmafärbung war neben der hellblauen Krümelfärbung zu sehen.

Die Zellen von *Spirogyra* erschienen mit violetten (la 11) Krümeln dicht erfüllt. Im Fluoreszenzmikroskop leuchteten die Zellen stark rot.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Auch im sauren Bereich ($p_H = 4{,}6$) kam es zu keiner elektroadsorptiven Zellmembranfärbung, da der Farbstoff in praktisch undissoziierter Form vorliegt.

Toluidinblau.

Der Hellfeldfarbstoff Toluidinblau wird wegen seiner günstigen Farbunterschiede bei der Speicherung im Zellsaft gerne verwendet (Czaja 1936, Drawert 1940, Höfler und Schindler 1951, Wiesner 1951, Hirn 1953). Der Umschlagspunkt liegt nach Drawert 1940 bei p_H 9,5—10. Die vollen Zellsäfte speichern den Farbstoff mit blauer (pg 13) bis grünblauer Farbe, während leere eine violette (ia 8—10) Farbtönung aufweisen.

Die Zellwände speichern im sauren Bereich den Farbstoff Toluidinblau mit blauer (ne 13) Farbe. Bei einigen Arten waren auch bei höheren p_H-Werten die Querwände blau gefärbt.

Im alkalischen Bereich wird der Farbstoff im Zellsaft gespeichert. Der Farbstoff dringt rasch in die Zellen ein und wird stark angereichert, so daß schon nach kürzesten Färbezeiten eine deutliche Tingierung des Zellsaftraumes in Erscheinung tritt, die bei vollen Zellsäften blau, bei leeren violett ist.

Netrium digitus besitzt bekanntlich (Höfler und Schindler 1955) volle Zellsäfte. Mit Toluidinblau gefärbt, erhält man blaue (pg 13) Tröpfchen, die sich anfangs in BMB befinden. Die Tröpfchen nehmen später an Zahl und Volumen zu. Volle Zellsäfte hat auch *Cylindrocystis Brebissonii* (vgl. Hirn 1953). *Cosmarium conspersum* hingegen zeigte violette Vakuolenfärbung. Auch die untersuchten *Spirogyren* besitzen volle Zellsäfte. Es ist vor allem die blaugrüne (la 7) Krümelfärbung zu erkennen. Selten nur sieht man eine diffus blaue Vakuolenfärbung.

Unter den Desmidiaceen, die ja meist leere Zellsäfte besitzen, fiel *Euastrum* durch ein abweichendes Verhalten auf. Während *Euastrum binale* und *Eu. verrucosum* stets violette Vakuolenfärbung zeigten, waren bei *Euastrum insigne, Eu. affine* und *Eu. didelta* stets blaugrüne Tröpfchen im Zellsaft beziehungsweise Körnchen im Plasma neben der violetten Zellsaftfärbung sichtbar. Ebenso waren bei *Euastrum oblongum* die blaugrünen Tröpfchen zu sehen, jedoch waren die Vakuolen meist hellblau gefärbt. Mit n/100 NH_3 entfärbte sich die Diffusfärbung völlig, die Tröpfchen jedoch blieben gefärbt.

Tetmemorus granulatus und *T. Brebissonii* zeigten im alkalischen Bereich stets nur blaue Tröpfchen, die zum Teil in BMB waren. Eine Diffusfärbung war nicht zu erkennen. Einmal konnte ich jedoch bei letzterer Art eine violette Zellsaftfärbung beobachten (la 11).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Das nachstehende Protokoll soll über das Verhalten einiger Arten Aufschluß geben.

Material: Tamsweg.

Farbstoff: Toluidinblau, 1 : 10.000, $p_H = 11{,}2$.

Färbezeit: 10 Minuten.

Eremosphaera viridis: Die Vakuole ist dunkelviolett gefärbt. Keine Vakuolenkontraktion.

Xanthidium cristatum: Violette Zellsaftfärbung.

Cosmarium cucurbita: Blaue Tröpfchen liegen im Plasma, sie haben die Farbe der Farblösung.

Arthrodesmus convergens: Violette Diffusfärbung des Zellsaftes.

Micrasterias papillifera: In den Endlappen violette Teilvakuolen, wandern ins Zellinnere und schließen sich zu größeren Teilvakuolen zusammen.

Closterium cynthia: Einige Zellen schwach violett diffus gefärbt, die anderen Zellen noch ungefärbt erscheinend.

Micrasterias denticulata: Violette Diffusfärbung, es entstehen dunklere blauviolette Tröpfchen.

Pleurotaenium nodulosum: Violette runde Tröpfchen.

Micrasterias apiculata: Violette Zellsaftfärbung.

Cosmarium pyramidatum: Viele blaue Tröpfchen, teilweise stilliegend, andere jedoch zeigen lebhafte BMB. (Stilliegend, also wohl im Plasma, frei beweglich im Zellsaft.)

Netrium digitus: Blaue Tröpfchenspeicherung. In den Zellen liegen Kopetzkysche Körperchen (vgl. Kopetzky-Rechtperg 1955), die vor dem Farbstoffzusatz orange Färbung aufweisen. Mit Toluidinblau färben sie sich ebenfalls blau, so daß sie nur schwer von den Entmischungstropfen zu unterscheiden sind.

Cosmarium amoenum: Viele runde violette Teilvakuolen.

Die leeren Zellsäfte lassen sich, wie Höfler (1947) zeigte, mit Ammoniak entfärben. Ich wiederholte diese Versuche mit Erfolg bei zahlreichen Objekten (vgl. Tabelle 2). Die vollen Zellsäfte behalten, wie bekannt, ihre Färbung auch nach Behandlung mit n/100 NH_3. Bei einigen Zellen jedoch verschwand die Diffusfärbung, doch blieben gefärbte Tröpfchen im Zellsaft zurück, die sich auch nach längerer Behandlung mit Ammoniak nicht entfärbten. Bei *Closterium acutum* zum Beispiel konnte ich bei Färbung mit Toluidinblau $p_H = 11{,}6$ einige blaue Tröpfchen, die rasch an Größe zunahmen, neben der violetten Diffusfärbung des Zellsaftes erkennen. Bei Entfärbungsversuchen mit Ammoniak verschwand die Diffusfärbung stets, die blauen Tröpfchen aber nicht.

Die anderen von mir untersuchten Closterien (*C. lunula, C. cynthia, C. libellula, C. insigne* und *C. acutum*) zeigten durchwegs violette Vakuolenfärbung. Zuerst war meist in den Endvakuolen eine Farbspeicherung zu sehen, erst dann trat eine deutliche Diffusfärbung des ganzen Zellsaftraumes in Erscheinung. Die Endvakuolen waren meist etwas dunkler gefärbt (vgl. Höfler u. Schindler 1953).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Micrasterien haben zumeist (vgl. auch Protokoll S. 919) leere Zellsäfte, das heißt, sie zeigen, mit Toluidinblaulösung gefärbt, violette Vakuolenfärbung. Die Vakuolen sind meist sehr stark kontrahiert, und viele Teilvakuolen sind in den Zellen sichtbar, die zuerst meist auf die Randlappen beschränkt sind (vgl. Kiermayer 1954). *Micrasterias fimbriata* zeigte jedoch viele kleine blaue Tröpfchen. *M. denticulata* speicherte den Farbstoff in Form von violetten Teilvakuolen, daneben entstanden zahlreiche blaue Tröpfchen.

Die Versuchsobjekte *Mougeotia, Gymnozyga, Oedogonium* und *Hyalotheca* werden später genauer besprochen.

Methylenblau.

Wie schon seit langem bekannt (vgl. Pfeffer 1886, Cholnoky 1937) ist Methylenblau für die pflanzlichen Zellen recht schädlich. Dieser Farbstoff liegt nur im extrem alkalischen Bereich als Farbbase vor, daher kommt es nur bei ganz hohen p_H-Werten zur Vakuolenfärbung. Der Umschlagspunkt liegt nach Drawert (1940) etwa bei p_H 10—11.

Der Farbstoff wurde in der Konzentration 1 : 10.000 angewandt. Die Färbezeiten waren wegen der Schädlichkeit des Farbstoffes meist nur kurz.

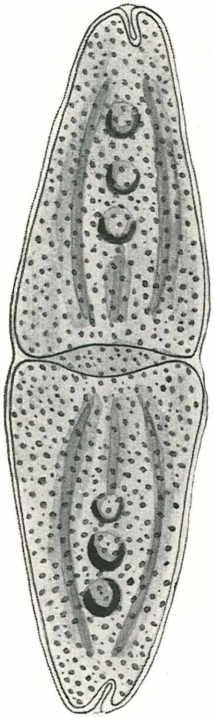
Die Zellwand reichert den Farbstoff sehr stark in einem blauen (ne 13) Farbton an. Die Querwände der Fadenalgen sind oft violett gefärbt. Die Färbung der Zellwände reicht weit in den alkalischen Bereich, bei manchen Species, wie *Micrasterias americana, M. fimbriata* (Abb. 4), *Arthrodesmus convergens* (Abb. 3) und anderen, ist noch bei $p_H = 12{,}2$ eine Zellwandfärbung zu erkennen, nur ist sie hier meist etwas schwächer.

Die Färbung mit Methylenblau ergibt im extrem hohen alkalischen Bereich fast durchwegs blaue, nur zuweilen violette Zellsaftfärbung[2]. Bei wenigen Arten liegt die Färbeschwelle zwischen Membran- und Zellsaftfärbung etwas tiefer (vgl. Tabelle 4). Bei $p_H = 11{,}0$ konnte ich bei Objekten mit leeren Zellsäften innerhalb der üblichen Färbezeiten im allgemeinen noch keine Vakuolenfärbung erhalten. Nur bei sehr langer Einwirkung des Farbstoffes kam es auch hier manchmal zur Farbspeicherung im Zellsaft. Objekte mit vollen Zellsäften hingegen reichern den Farbstoff schon nach kürzerer Zeit innerhalb der Zelle an.

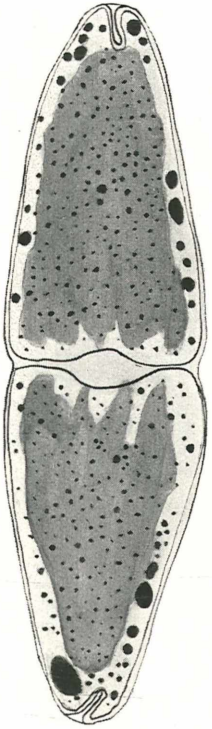
Bei *Cylindrocystis Brebissonii* waren bei $p_H = 11{,}0$ einzelne blaue Entmischungstropfen neben den blaugrünen Tröpfchen im

[2] Läßt man Algen unter dem Deckglas in der feuchten Kammer liegen, so verbleicht die Violettfärbung innerhalb der lebenden Zellen. Nach Kiermayer (1955) handelt es sich hierbei um Redox-Phänomene, um Bildung von Leukobasen bei Sauerstoffmangel.

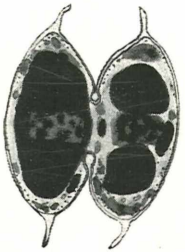
©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



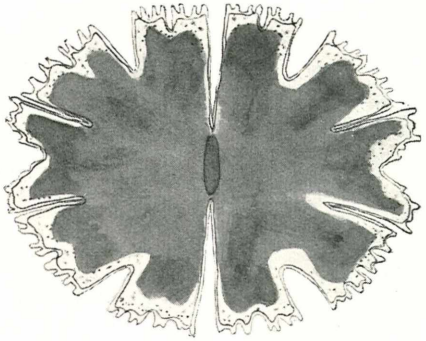
1



2



3



4

Abb. 1. *Tetmemorus granulatus.* Nach 10 Minuten langer Färbung mit Methylenblau 1 : 10.000, p_H 4,6. Blaue Tröpfchenspeicherung im Plasma. Leichte Zellwandfärbung. — Abb. 2. Eine Zelle mit p_H 12,2, 10 Minuten gefärbt. Einzelne blaue Teilvakuolen, blaue Tröpfchenspeicherung. — Abb. 3. *Arthrodesmus convergens,* mit Methylenblau 1 : 10.000, p_H 12,2, 10 Minuten gefärbt. Dunkelviolette Vakuolenfärbung. Leichte Zellwandfärbung. — Abb. 4. *Micrasterias fimbriata.* Gleiche Färbung, 3 Minuten, Diffusfärbung des Zellsaftes.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Plasma zu sehen. Bei *Netrium digitus* erschienen bei Färbung mit dieser p_H-Stufe blaue Tröpfchen, die zuerst BMB zeigten, sich allmählich vergrößerten, an Farbintensität zunahmen und ihre Beweglichkeit verloren. *Euastrum oblongum* zeigte bei dieser p_H-Stufe eine starke Färbung der Vakuole in der Zellachse, die Teilvakuolen außen waren nur schwach tingiert. *Euastrum affine* ergab beim gleichen p_H-Wert erst nach 20 Minuten langer Färbung blaugrüne Körnchen (la 16).

Auch bei *Tetmemorus granulatus* liegt die Färbeschwelle bei 10 Minuten langer Färbung mit Methylenblau bei $p_H = 12{,}2$. Bei p_H 12,5 war der Zellsaft zuerst diffus hellblau gefärbt, kleine dunkle Tröpfchen (na 13) schieden sich ab und flossen zu großen Entmischungstropfen zusammen. Zur Zellwandfärbung kam es allerdings erst bei p_H 10,5. Im Plasma wurde der Farbstoff im ganzen p_H-Bereich in Form von blauen Tröpfchen gespeichert (Abb. 1, 2). In nachstehender Tabelle 3 werden die Versuchsergebnisse bei den einzelnen p_H-Stufen und im Vergleich dazu die Färbebilder mit Brillantcresylblau wiedergegeben. Mit letzterem Farbstoff wurde die Zelle bis $p_H = 8{,}2$ gefärbt. Besonders auffällig ist die Tröpfchenspeicherung im sauren p_H-Bereich.

Es war erstaunlich, zu sehen, daß die Zellen von *Eremosphaera viridis,* die im allgemeinen sehr empfindlich sind, den Farbstoff Methylenblau gut vertrugen. Bei Kurzfärbung waren die Zellen fast überhaupt nicht sichtbar gefärbt. Es mußten längere Färbezeiten verwendet werden, was die Zellen gut aushielten. Anfänglich glaubte ich, daß die eckigen Plasmolyseformen auf eine leichte Schädigung durch die Färbung zurückzuführen seien, die Vakuolen rundeten sich aber nach einiger Zeit vollkommen ab. Plasmolysierte ich jedoch ungefärbte Zellen mit 0,7 mol Traubenzucker, so zeigten sich dieselben Erscheinungen, und erst nach längerer Zeit ist die Plasmolyse vollständig konvex. Bei 15 Minuten langer Färbung war die Vakuole im alkalischen Bereich (bis $p_H = 11{,}6$) ganz schwach hellblau gefärbt. Der Farbstoff wird von *Eremosphaera*-Zellen immer diffus gespeichert. Eine Tröpfchenspeicherung war nie zu sehen. Auch zeigte die Vakuole nie eine Kontraktion. Bei 10 Minuten langer Färbung war nur bei $p_H = 12{,}5$ eine Vakuolenfärbung zu erkennen. Die Zellwand speicherte den Farbstoff auch im ganz sauren Bereich nur schwach oder gar nicht.

Im allgemeinen konnten bei der Färbung mit Methylenblau nur blaue Vakuolenfärbungen beobachtet werden. In einigen Fällen jedoch ausnahmsweise auch violette Vakuolen. So waren *Oedogonien* oft blau, manchmal wieder violett (gc 10) gefärbt, ebenso konnten bei *Gymnozyga Breb.* violette diffuse Zellsaftfärbung und

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 3.

Färbeergebnisse mit Methylenblau an *Tetmemorus granulatus*

Mischungsverhältnisse der Stammlösungen		p_H	Vakuole	Plasma	Membran
primär	tertiär				
0	10	12,5	++		—
1	9	12,2	+		—
2	8	11,6	—		—
3	7	11,0	—		—
4	6	10,5	—		+
4,5	5,5	9,6	—		+
5	5	8,2	—		+
6	4	7,5	—		+
8	2	6,8	—		+
10	0	4,6	—		+

Färbeergebnisse mit Brillantcresylblau an *Tetmemorus granulatus*

Mischungsverhältnisse der Stammlösungen		p_H	Vakuole	Plasma	Membran
primär	tertiär				
0	10	12,5	+		—
1	9	12,2	+		—
2	8	11,6	+		—
3	7	11,0	+		+
4	6	10,5	+		+
4,5	5,5	9,6	+		+
5	5	8,2	+		+
6	4	7.5	—		+
8	2	6,8	—		+
10	0	4,6	—		+

Erklärung zu Tabelle 3:

Das Material stammt von Tamsweg, wo in einem der Algenfläschchen (I/12) *Tetmemorus granulatus* sehr zahlreich, ja fast rein enthalten war. Die Farblösungen Methylenblau und Brillantcresylblau wurden in der Konzentration 1 : 10.000 hergestellt, die Färbezeit betrug 10 Minuten.

++ Sehr starke Farbspeicherung,
\+ starke Farbspeicherung,
— ungefärbt erscheinend,
× blaue Tröpfchen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 4

Methylenblau 1:10.000. Färbezeit 15 Minuten. Material Tamsweg.

Mischungsverhältnisse der Stammlösungen primär / tertiär	4 / 6		3 / 7		2 / 8		1 / 9		0 / 10		
p_H	10,5		11,0		11,6		12,2		12,5		
Objekte	V.	M.	V.	M.	V.	M.	V.	M.	V.	M.	Bemerkungen
Micrasterias fimbriata	——	++	——	++	——	++	+	++	++	——	Gürtel stets blau gefärbt
Arthrodesmus convergens	——	++	——	++	——	++	+	+	++	——	
Closterium cynthia	——	++	——	++	—	+	+	—	++	——	
Micrasterias truncata...	——	++	——	++	——	+	+	—	++	——	
Micrasterias denticulata.	——	++	——	++	——	++	+	—	++	——	
Micrasterias americana.....	——	++	——	++	——	++	+	+	++	—	
Tetmemorus granulatus	——	+	——	+	——	+	+	——	++	——	stets blaue Körnchenspeicherung im Plasma
Euastrum oblongum.	+	++	++	+	++	——	++	——	++	——	stets blaue Körnchenspeicherung im Plasma
Euastrum verrucosum	——	+	++	+	++	+	++	+	++	——	
Eremosphaera viridis	——	+	—	+	+	—	++	—	++	——	
Xanthidium cristatum	——	++	——	+	——	++	+	—	++	—	
Closterium striolatum	——	++	——	+	——	——	——	——	——	——	
Cosmarium sp.	——	++	——	++	—	+	+	+	+	—	ab p_H 11,6 blaue Körnchensp. im Plasma
Staurastrum scabrum.....	——	++	——	++	—	+	+	+	++	——	
Allium cepa: Innenepidermis	——	++	——	++	——	++	+	+	++	—	

Erklärung: ++ starke Farbstoffspeicherung; + mäßige Farbstoffspeicherung; — der Farbstoff wird fast gar nicht angereichert; —— keine Farbstoffanreicherung; V. Vakuole; M. Membran.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

blaue Entmischungstropfen beobachtet werden. *Mougeotia* war meist zuerst hellblau diffus gefärbt, die Farbe wurde dann stärker gespeichert, und es schieden sich einige dunkelblaue Teilvakuolen ab. Daneben waren die stets blaugrün (pa 17—18) gefärbten Gerbstoffbläschen zu sehen. Einige Male wurde aber bei $p_H = 12{,}5$ auch violette Diffusfärbung des Zellsaftes erzielt.

Die Vakuolenfärbung bei den untersuchten *Cosmarien* war stets blau, die Zellwände waren bis hoch in den alkalischen Bereich ($p_H = 12{,}2$) hinauf gefärbt. *Cosmarium cucurbita* hatte an den Enden der Zelle dunkelblaue Teilvakuolen, der Farbstoff wurde weiters in blaugrünen (pa 18) Tröpfchen gespeichert, die im Plasma liegen dürften (vgl. Hirn 1953). Diese Tröpfchenspeicherung war auch noch bei $p_H = 7{,}5$ neben der Zellwandfärbung zu sehen.

Spirogyra-Zellen zeigten bei 10 Minuten langer Färbung im alkalischen Bereich hellblaue (la 15) Diffusfärbung der Vakuolen, dunklere Tröpfchen (pe 14) waren in leichter BMB. Die Querwände waren stets intensiver und bis hoch in den alkalischen Bereich hinein gefärbt (vgl. Huber 1955).

Aus der Tabelle 4 sind die Färbeschwellen mit Methylenblau 1 : 10.000 ersichtlich. Die Färbezeit betrug 15 Minuten. Das Material stammte aus Tamsweg. Zum Vergleich wurde die Innenepidermis von *Allium cepa*, die leere Zellsäfte hat, mit Methylenblau gefärbt. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Färbeschwelle für die meisten Objekte mit leeren Zellsäften zwischen 11,6 und 12,2 liegt. Es sei aber hervorgehoben, daß sich diese bei längeren Färbezeiten mehr gegen den sauren Bereich hin verschiebt (vgl. S. 928).

Brillantcresylblau.

Brillantcresylblau ist als ein weitgehend unschädlicher Farbstoff zu bezeichnen und als solcher in der Vitalfärbung sehr beliebt (vgl. A. P. Dangeard 1916, Irwin 1922, 1927, Guilliermond-Atkinson 1950, Loub 1951, Höfler und Schindler 1955).

Der Farbstoff hat seinen Umschlagspunkt etwa bei $p_H = 8$—9 (nach Drawert 1940). Er wurde in der Konzentration 1 : 10.000 verwendet. Es wurden, wie schon anfangs (S. 911) erwähnt, zwei Präparate des Farbstoffes (von Grübler und von Merck) benützt und es erwies sich letzterer als etwas schädlicher. Außerdem war oft ein Unterschied im Farbton bei der Färbung mit den beiden Präparaten zu erkennen. So waren die Vakuolen mit dem Präparat von Grübler zunächst violett gefärbt, während mit dem anderen die Vakuolen kobaltblau waren. Es stellte sich aber später heraus, daß bei längerer Einwirkungsdauer auch diese Zellen, die mit dem Grübler-Präparat gefärbt waren und anfangs violett erschienen sind, dieselbe Färbung aufwiesen.

Zur Untersuchung, ob volle oder leere Zellsäfte bei den verschiedenen Algenarten vorliegen, ist Brillantcresylblau nicht sehr

geeignet, da die Erscheinung der Metachromasie, wie sie bei anderen Farbstoffen auftritt, hier bedeutend schwerer faßbar ist.

Im sauren Bereich wurden meist nur die Zellwände blau (ne 13) gefärbt. Die Querwände der fadenförmigen Algen waren auch im alkalischen Bereich gefärbt. So zeigte zum Beispiel *Mougeotia* sp. auch bei $p_H = 11{,}6$ blaue Vakuolenfärbung, blaugrüne Gerbstoffbläschen und violett gefärbte Querwände.

Wie gesagt, ist der Unterschied der Färbung zwischen vollen und leeren Zellsäften mit Brillantcresylblau nicht so deutlich sichtbar. Die leeren Zellsäfte erscheinen sowohl violett als auch kobaltblau gefärbt, während volle Zellsäfte eine hellblaue bis grünblaue Färbung aufweisen. So zeigte *Spirogyra* stets zuerst eine hellblaue Diffusfärbung, daneben grünblaue Krümelfällung. Nach einiger Zeit waren in manchen Zellen dunkelblaue (nc 14) Teilvakuolen zu erkennen. Mit verdünnter Ammoniaklösung blieb die Färbung stets erhalten. Bei *Netrium digitus* war der Farbstoff in Form von blauen Tröpfchen gespeichert. Auch bei $p_H = 4{,}6$ war noch Anreicherung des Farbstoffes im Zellsaft zu sehen.

Closterium cynthia, das leere Zellsäfte hat, zeigte nach 15 Minuten langer Färbung mit Brillantcresylblau nur bei $p_H = 12{,}5$ violette Vakuolenfärbung. Wurden die Zellen länger gefärbt, so verschob sich die Färbeschwelle bis $p_H = 11{,}0$. Der Farbstoff wurde mit violettem (la 12) Farbton gespeichert. Bei $p_H = 11{,}0$ jedoch war eine deutliche hellblaue Vakuolenfärbung zu erkennen. *Closterium libellula* speicherte die Farbbase mit violetter Farbe in den Endvakuolen und vielen kleinen blauen (pa 13) Entmischungströpfchen. *Closterium striolatum* war stets ungefärbt.

Ein sehr schönes Bild boten die mit Brillantcresylblau gefärbten Zellen von *Micrasterias truncata*. Neben der hellblau bis blauen Vakuolenfärbung, die bis $p_H = 7{,}5$ reichte, war die Membran stets blau, die Innenmembran hingegen violett (ia 10) tingiert. Diese Innenmembranfärbung reichte bis $p_H = 12{,}2$.

Merkwürdig war das Verhalten zweier Zellen von *Micrasterias truncata*, die in Teilung waren. Dem Präparat war Farbstoff ($p_H = 4{,}6$) zugesetzt worden. Hier wurde der Zellsaft noch gefärbt, und zwar war die eine Hälfte der Zellen hellblau gefärbt und wies blaue Tröpfchen auf, während die andere, kleinere Hälfte, violette, stark kontrahierte Vakuolen enthielt und violette Tröpfchenspeicherung hatte.

Eremosphaera viridis erschien zuerst meist violett diffus gefärbt, der Farbton schlug bei längerer Einwirkungsdauer (ungefähr nach 10—15 Minuten) in einen kobaltblauen (na 14) Farbton um. Nach Wiesner (1950) entspricht dieses Blau bei der

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Ta-

Mischungsverhältnisse der Stammlösungen		Färbeschwellen mit Brillantcresylblau (Präparat Grübler)									
	primär	10		8		6		5		4,5	
	tertiär	0		2		4		5		5,5	
p_H		4,6		6,8		7,5		8,2		9,6	
Objekte		V.	M.	V	M.	V.	M.	V.	M.	V.	M.
Eremosphaera viridis		—	+	++	+	++	+	++	—	+	—
Closterium striolatum		—	+	—	+	—	+	—	—	—	—
Micrasterias denticulata		—	++	+	++	+	++	++	+	+	++
Micrasterias fimbriata		+	++	++	+	++	+	++	+	++	+
Tetmemorus granulatus		—	+	—	+	—	+	++	—	++	—
Arthrodesmus convergens		—	++	—	++	—	+	+	+	+	+
Closterium cynthia		—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
Euastrum oblongum		+	++	+	+	+	+	+	—	+	—
Micrasterias rotata		—	++	—	++	+	+	+	—	+	—
Micrasterias truncata		—	++	—	++	++	++	+	+	+	+
Cosmarium sp.		—	++	+	+	++	+	++	+	++	+
Netrium digitus		+	++	+	++	++	++	++	+	++	+
Xanthidium cristatum		—	++	—	+	—	+	+	+	+	+
Staurastrum teliferum		—	++	+	—	+	++	++	+	+	+
Allium cepa, Innenepidermis		—	++	—	++	+	+	++	+	++	+

Erklärung: ++ starke Farbstoffspeicherung; + mäßige Farbstoff-

belle 5.

1:10.000. Färbezeit 15 Minuten. Material Tamsweg.

4		3		2		1		0		Bemerkungen
6		7		8		9		10		
10,5		11,0		11,6		12,2		12,5		
V.	M.	V.	M.	V.	M.	V.	M.	V.	M.	
++	—	++	—	+	—	++	—	++	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
++	—	+	++	+	++	++	+	++	—	Vakuole blau, Membran violett gefärbt
++	+	++	+	++	+	++	—	++	—	Blaue Tröpfchenspeicherung
++	—	+	—	+	—	++	—	++	—	Im ganzen p_H-Bereich blauviolette Tröpfchenfällung
++	—	++	+	++	—	++	—	++	—	
—	—	+	—	+	—	+	—	++	—	
+	—	+	—	+	—	++	—	++	—	Im ganzen p_H-Bereich blaue Tröpfchenfällung
++	++	++	+	+	+	++	—	++	—	Teilweise blaugrüne Tröpfchen
++	+	++	++	++	+	++	+	++	—	Vakuolen hellblau bis blau, Innenmembran violett, Außenmembran blau
++	+	+	—	+	—	++	—	++	—	Dunkelblaue Tröpfchenspeicherung
++	+	++	—	++	—	++	—	++	—	Blaue Membranfärbung Blaue Tröpfchen
++	+	++	+	++	+	++	—	++	—	Violette Membranfärbung
+	+	+	—	+	+	++	—	++	—	Blaue Membranfärbung
++	+	++	—	++	—	++	—	++	—	

speicherung; — der Farbstoff wird nicht angereichert.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Innenepidermis von *Allium cepa* dem Farbton der leeren Zellsäfte. *Netrium interruptum* hatte ebenfalls blaue Vakuolenfärbung, die Endvakuolen waren stets dunkelblau gefärbt. Jedoch war bei $p_H = 6{,}8$ keine Vakuolenfärbung mehr zu erreichen.

Während bei Färbungsversuchen mit Methylenblau die Tröpfchenspeicherung von *Euastrum oblongum* und *Tetmemorus granulatus* stets die gleiche Färbung zeigte, nämlich grünblau, so war mit Brillantcresylblau ein Unterschied in der Farbe zwischen den beiden Objekten zu erkennen. Bei *Euastrum oblongum* und *Euastrum insigne* traten hellblaue bis grünblaue Tröpfchen beziehungsweise Körnchen im Plasma auf (Abb. 5, 6). Die Tröpfchen bei *Tetmemorus granulatus* jedoch waren blauviolett. Beide Arten speicherten im alkalischen Bereich den Farbstoff mit hellblauer Farbe in der Vakuole. Bei einigen Versuchen zeigte aber *Tetmemorus,* mit ($p_H = 12{,}5$) Brillantcresylblau gefärbt, violette Vakuolenfärbung (la 11). Die Vakuolen waren in mehrere Teilvakuolen zerklüftet, die schön abgerundet waren.

In vorstehender Tabelle 5 sind die Färbeschwellen für einige Algen bei 15 Minuten langer Färbung mit Brillantcresylblau (Marke: Grübler) angegeben und im Vergleich dazu das Verhalten der Innenepidermis von *Allium cepa.* Das Algenmaterial stammte aus Tamsweg. Der Farbstoff wurde in der Konzentration 1 : 10.000 angewandt.

IV. Abhängigkeit der Färbung von der Einwirkungsdauer der Farbstoffe.

Im allgemeinen ist kein allzugroßer Unterschied zwischen Kurz- und Langfärbung zu erkennen, abgesehen von der schädigenden Wirkung auf die Pflanzenzellen, die bei den einzelnen Farbstoffen verschieden ist und mit der Zeit ansteigt. Die sichtbare Färbung ist auch von der Konzentration des Farbstoffes abhängig. Je schwächer diese ist, desto später ist eine deutliche Färbung zu erkennen.

Wie Strugger (1935) gezeigt hat und heute allgemein bekannt ist, können die Zellen den Farbstoff in ihren verschiedenen Bestandteilen festlegen. Der Ort der Farbstoffspeicherung ist vom p_H-Wert des Farbstoffes abhängig. Während im sauren Bereich vor allem die Membran speicherungsfähig ist, reichert im alkalischen Bereich der Zellsaft den Farbstoff an. Bei manchen Algen wird diese Färbeschwelle zwischen Vakuolen- und Membranfärbung noch weiter in den sauren Bereich hinein verschoben, wenn der Farbstoff etwas länger auf die Zellen einwirkt. Dies

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

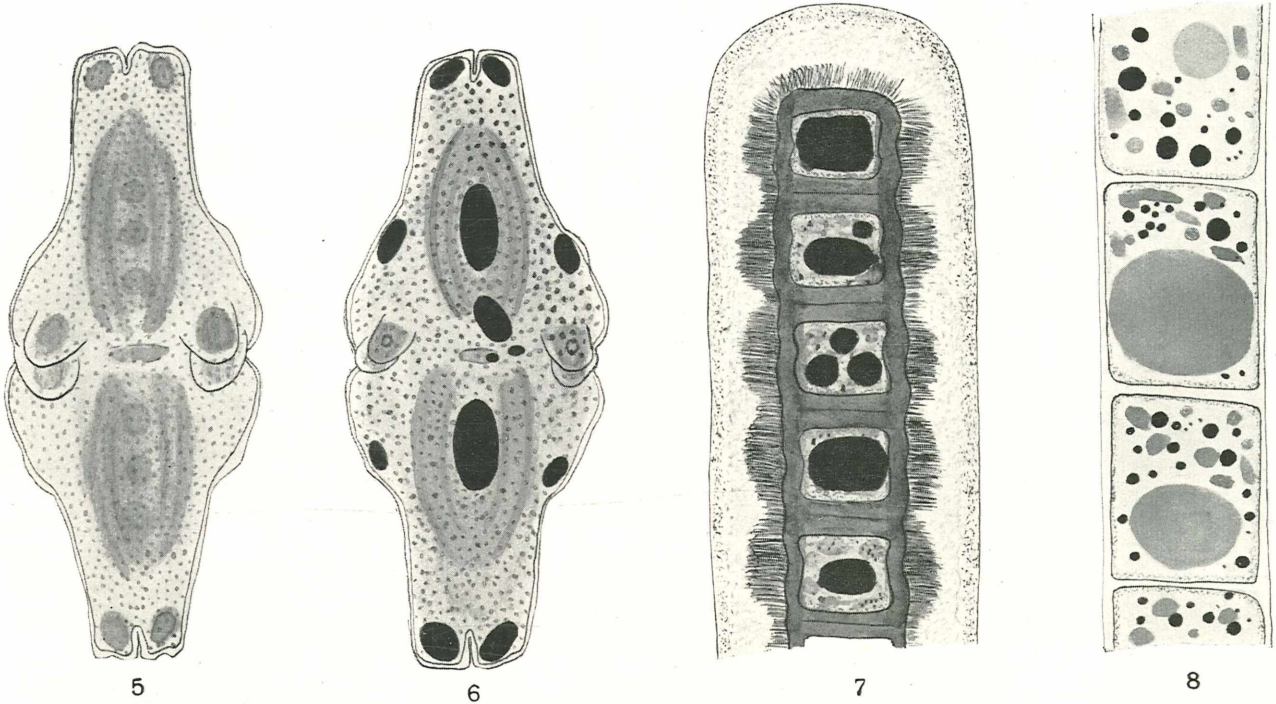


Abb. 5. *Euastrum insigne*, mit Brillantcresylblau 1 : 10.000, p_H 6,8, 10 Minuten gefärbt. Hellblaue Tröpfchenspeicherung im Plasma. — Abb. 6. Eine Zelle, gefärbt mit p_H 12,2. Hellblaue Tröpfchenspeicherung, etwas dunklere blaue Teilvakuolen. — Abb. 7. *Hyalotheca dissiliens*, mit Neutralrot 1 : 10.000 in Leitungswasser gelöst (p_H 7,8). Zellsaft diffus rot gefärbt, Gallerthülle rosa. Abgerundete rote Teilvakuolen. Büschelförmige Farbansammlungen, von der Membran in die Gallerthülle ausstrahlend. — Abb. 8. *Zygogonium* sp. Gefärbt mit Toluidinblau 1 : 10.000, p_H 11,6, 10 Minuten, violette Vakuolenfärbung, dunkelblaue Tröpfchen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ist folgendermaßen zu erklären: Die Aufnahme von basischen Vitalfarbstoffen in die lebende pflanzliche Zelle ist vor allem von den Dissoziationsverhältnissen des Farbstoffes abhängig (vgl. Strugger 1936, Drawert 1940, 1948, 1951, Höfler 1947, 1949). Oberhalb des Umschlagpunktes herrschen die lipoidlöslichen Farbmoleküle vor, die leicht ins Zellinnere eindringen können. Im darunterliegenden Bereich liegt der Farbstoff zum größten Teil in ionisierter Form vor, kann also nur elektroadsorptiv von der Zellwand gebunden werden. Nun ist es aber nicht ganz richtig, von einem „Umschlagspunkt" zu sprechen, da der Übergang von der molekularen in die dissoziierte Form nur allmählich vor sich geht (vgl. Höfler 1947, 1948, 1949). In einem weiten Übergangsbereich sind neben den Farbionen noch Farbmoleküle vorhanden. Daher ist also bei längeren Färbezeiten auch im schwach sauren Bereich durch das Vorhandensein weniger Farbmoleküle eine Färbung des Zellinneren möglich (vgl. Kinzel 1954). Für *Diatomeae* konnte Höfler und Schindler (1951) und Hirn (1953) auffällig tiefe Färbegrenzen des Zellinneren feststellen. Aber auch bei einigen anderen Süßwasseralgen wird die Färbeschwelle bei längeren Färbezeiten gegen den sauren Bereich hin verschoben.

Die nachstehende Tabelle 6 soll an einigen Beispielen zeigen, daß die Färbeschwelle stark von der Einwirkungsdauer des Farbstoffes abhängig ist. Die Versuche wurden mit dem nicht allzu schädlichen blauen Farbstoff Brillantcresylblau durchgeführt. Der Lebenszustand der Zellen wurde jeweils durch Plasmolyse mit 0,8 mol Traubenzuckerlösung geprüft. Die Zellen waren durchwegs konvex gerundet.

Auch mit Methylenblau ließ sich bei einigen Versuchsobjekten durch Langfärbung der Umschlagspunkt zwischen Zellsaft- und Zellwandfärbung mehr in den sauren Bereich verschieben. Jedoch ist bei den meisten Objekten starke Membranfärbung zu erkennen, und es war nur nach Entfärbung der Membran mit $CaCl_2$ möglich, zu entscheiden, ob der Zellsaft den Farbstoff angereichert hat. Dennoch ist die Möglichkeit, daß primär die Zellwand gefärbt war und erst später der Farbstoff in die Zelle hineindiffundiert ist, nicht von der Hand zu weisen. Bei *Eremosphaera viridis* jedoch war dieser Fall ausgeschlossen, da vorerst keine Membranfärbung zu erkennen war. Die Zellen wurden mit Methylenblau 1 10.000, 10 Minuten lang gefärbt, die Vakuole reicherte den Farbstoff bei $p_H = 11{,}0$ nicht an. Wurde der Farbstoff jedoch 45 Minuten einwirken gelassen, so wurde noch bei $p_H = 10{,}5$ Vakuolenfärbung erzielt. Die Zellen waren mit 0,7 mol TRZ konvex plasmolysierbar.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 6.

Abhängigkeit der Färbeschwellen von der Einwirkungsdauer des Farbstoffes

Farbstoff: Brillantcresylblau (Marke Grübler) 1 : 10.000

p_H um (darunter das Mischungsverhältnis der Stammlösungen)	4,6	6,4	6,8	7,5	8,2	9,6	10,5	11,0	11,6	12,2	12,5
primär	10	9	8	6	5	4,5	4	3	2	1	0
tertiär	0	1	2	4	5	5,5	6	7	8	9	10
Objekte											
Eremosphaera viridis											
Micrasterias rotata											
Cosmarium sp.											
Closterium cynthia											
Euastrum oblongum											
Cosmarium cucurbita											
Micrasterias truncata											

Erklärung: Die hellen Streifen geben die Färbbarkeit der Vakuolen bei 15 Minuten langer Färbung wieder, die dunklen nach einstündiger Färbung.

Bei kürzerer Einwirkungszeit ist aber auch im hohen p_H bei einigen Algen keine deutliche Vakuolenfärbung sichtbar. Manche Spezies von *Oedogonium* ließen zum Beispiel mit Neutralrot, 1 : 10.000, in Wiener Leitungswasser gelöst ($p_H = 7{,}8$), erst nach 15 Minuten langer Färbung eine deutlich sichtbare Vakuolenfärbung erkennen. So war bei $p_H = 11{,}0$ mit Methylenblau 1 : 10.000

bei 10 Minuten langer Färbung bei *Micrasterias denticulata, M. rotata, M. fimbriata, Arthrodesmus convergens* und *Euastrum oblongum* noch keine Vakuolenfärbung zu sehen.

Mit Toluidinblau 1 10.000 zeigte sich bei *Zygogonium* sp. bei $p_H = 10{,}1$ erst nach 30 Minuten violette Vakuolenfärbung, nach 60 Minuten waren blaue Tröpfchen sichtbar. Bei $p_H = 7{,}5$ war nach 10 Minuten das Zellinnere noch ungefärbt, nach 40 Minuten war jedoch eine leicht violette Diffusfärbung zu erkennen.

Bei diesen Versuchen dürfte also doch die längere Einwirkungsdauer des Farbstoffes auf die Zellen für die Vakuolenfärbung ausschlaggebend sein.

V. Vitalfärbeverhalten einzelner interessanter Arten.

Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der Vitalfärbung und durch Behandlung mit Ammoniak festzulegen, ob es sich um „volle" oder „leere" Zellsäfte handelt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß manche Arten eine eindeutige Bestimmung nicht zulassen und sich bei Färbungen anders verhalten. — Es könnte sich hierbei um „Übergangsformen von vollen zu leeren Zellsäften" handeln.

Es sollen nun im weiteren einzelne Versuchsergebnisse angeführt werden.

1. *Zygogonium* sp.:

Eine Art Zwischenstellung zwischen „vollen" und „leeren" Zellsäften nimmt *Zygogonium* ein. Es verhält sich in bezug auf seine Färbbarkeit gegenüber Methylenblau und Brillantcresylblau wie ein voller Zellsaft. Mit Toluidinblau zeigt es gleichzeitig violette Vakuolenfärbung und blaue Tröpfchen. Mit Rhodamin sind die Zellen nicht färbbar wie leere Zellsäfte.

Die Zellen von *Zygogonium* sind zylindrisch bis tonnenförmig mit derber, vereinzelt geschichteter Membran. Die Zellen besitzen je zwei Chromatophoren, die unregelmäßig geformt und oft durch einen axilen Plasmastrang verbunden sind.

Mit Toluidinblau im alkalischen Bereich, in der Konzentration 1 : 10.000 gefärbt, verhielten sich die Zellen folgendermaßen: Es zeigte sich violette (ia 11) Vakuolenfärbung, gleichzeitig erschienen dunkelblaue (pg 13) Tröpfchen (Abb. 8). Mit n/100 NH_3 behandelt, verschwand die violette Vakuolenfärbung sofort, während die blauen Tröpfchen sich nicht entfärbten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Methylenblau (1 : 10.000, $p_H = 11{,}2$) ergab bei 10 Minuten langer Färbung eine diffuse blaue (nc 14) Vakuolenfärbung.

Mit Brillantcresylblau sind keine eindeutigen Färbeergebnisse festzulegen. Der Farbstoff wurde in der Konzentration 1 : 10.000 angewandt, und im alkalischen Bereich kam es bei einigen Versuchen zur blauen (nc 14) Vakuolenfärbung. Hingegen zeigten die Zellen, mit dem gleichen Farbstoff behandelt, einige Male violette (ia 11) Vakuolenfärbung.

Mit n/100 NH_3 ließen sich die Zellen nicht entfärben.

Im sauren Bereich wurde mit den beiden blauen Farbstoffen Methylenblau und Brillantcresylblau blaue Zellwandfärbung (ne 13) erzielt, während mit Toluidinblau bei $p_H = 7{,}5$ die Zellwände schwach violett gefärbt waren und eine leicht violette Diffusfärbung des Zellsaftes zu erkennen war.

Die Färbung mit Neutralrot ergab rotviolette Vakuolen, bei $p_H = 4{,}6$ dunkle, fast schwarz erscheinende Zellwandfärbung.

Entfärbungsversuche mit Ammoniak bleiben zu wiederholen. Es ist möglich, daß die Konzentration zu stark schädigend wirkte.

Eingehende Versuche mit *Zygogonium* stehen noch aus; sie wären von Interesse, wenn es sich wirklich um einen vollen Zellsaft handelte.

2. *Hyalotheca mucosa* u. *H. dissiliens:*

Hyalotheca gehört zu den fadenartigen *Desmidiaceae*. Die Zellen, die kurz zylindrisch geformt sind, besitzen eine Gallerthülle, die zum Teil sehr dick sein kann (*H. mucosa*). Die Zellen von *Hyalotheca dissiliens* sind in der Mitte leicht eingeschnürt, *H. mucosa* hingegen ist nicht wellig gekerbt. Die Membran erscheint entweder glatt oder ist schwach punktiert.

Hyalotheca dissiliens zeigte mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt schöne Gallertfärbung (vgl. Höfler u. Schindler 1952). Kinzel hat in seiner Arbeit: „Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen“ (1952) eingehende Versuche über Vitalfärbung an *Hyalotheca dissiliens* durchgeführt. Es sollen hier also nur einige Versuchsergebnisse angeführt werden.

Wurden die Zellen von *H. mucosa* mit Neutralrot, in Leitungswasser ($p_H = 7{,}8$) in der Konzentration 1 : 10.000 behandelt, so kam es zur roten Membranfärbung. Der Zellsaft war dunkelrot (ia 6) gefärbt. Nur schwache Vakuolenkontraktion war sichtbar. Hier war die Gallerthülle ungefärbt. Die Zellen von *Hyalotheca dissiliens* zeigten mit dem gleichen Farbstoff behandelt diffus rot gefärbte Zellsäfte. Die Gallerthülle war zuerst hellrosa, dann deut-

lich rot gefärbt (Abb. 7). Strahlig von der Membran in die Schleimhülle ausgehende „Büschel" zeigten indessen rote Färbung (vgl. Kinzel 1952).

Läßt man Brillantcresylblau (1 : 10.000. $p_H = 11{,}6$—$12{,}5$) auf die Zellen einwirken, erscheint die Zellwand stark violett gefärbt. Mit 0,5 mol $CaCl_2$ konnten die Zellwände entfärbt werden, nun erst war eine Beobachtung des Zellsaftes möglich. Dieser war schwach violett gefärbt. Bei einem weiteren Versuch mit Brillantcresylblau blieb die Zellwand ungefärbt, der Farbstoff wurde in Form von blauen Tröpfchen gespeichert.

Mit Toluidinblau wurde bei hohem p_H eine violette Vakuolenfärbung erzielt. Die Vakuolen waren schwach kontrahiert, sie haben sich an den Ecken abgehoben. Methylenblau in der Konzentration 1 : 10.000, $p_H = 12{,}5$, ergab nach zwanzig Minuten langer Färbung hellblaue (ga 14) Vakuolen, die Zellwand war dunkelblau (la 13).

Rhodamin B 1 : 5000 wurde von den *Hyalotheca*-Zellen nicht angereichert.

Die Zellen, die mit Neutralrot in Leitungswasser 1 : 10.000 zehn Minuten lang gefärbt waren, ließen sich mit n/100 NH_3 nicht entfärben. — Ob etwa bei den mit NH_3 nicht entfärbbaren Zellen Tonoplastenstadien vorlagen, will ich nicht mit Sicherheit entscheiden. Spezielle Prüfung durch nachträgliche Zuckerplasmolyse steht noch aus.

Wie aus dem allgemeinen Teil der Untersuchungen hervorgeht, zeigten volle Zellsäfte mit Toluidinblau und Methylenblau blaue und mit Brillantcresylblau hellblaue Zellsaftfärbungen, mit Neutralrot violette, während mit Rhodamin B im Hellfeld eine diffus violette Färbung zu beobachten ist. *Hyalotheca* verhielt sich also gegenüber Neutralrot, Rhodamin B und Toluidinblau wie ein Objekt mit „leeren" Zellsäften, hingegen erschienen mit Methylenblau und zum Teil auch mit Brillantcresylblau Farbtöne, die „vollen" Zellsäften entsprechen.

3. *Gymnozyga Brebissonii:*

Gymnozyga ist ein Vertreter der fadenförmigen Desmidiaceen. Die Zellen sind tonnenförmig, fast doppelt so lang als breit, mit schwacher schmaler Einschnürung in der Mitte, die von einer zahnartigen Leiste begleitet ist. Die Zellen sind meist ohne deutliche Gallerthülle.

Im allgemeinen verhielten sich die Zellen wie „leere" Zellsäfte. Mit Rhodamin B färbten sie sich nicht an. Mit Neutralrot 1 : 10.000,

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

in Wiener Leitungswasser gelöst (p_H 7,8), gaben die Zellen meist folgende Färbebilder: Zuerst färbten sich die Zwischenzellwände dunkelrosa bis violett an, dann erst war schwache rosa Diffusfärbung des Zellsaftes zu beobachten, die allmählich an Intensität zunahm. Die Längswände waren ungefärbt. Nach längerer Zeit (etwa 20 Minuten) kontrahierten sich die Vakuolen etwas, und es waren meist zwei bis drei Teilvakuolen sichtbar, die sich schön abrundeten und einen dunkelroten Farbton aufwiesen. Daneben waren vereinzelte kleine violette Tröpfchen zu sehen, die sich in mehr oder weniger starker BMB befanden. Wurden die Zellen mit n/100 NH_3 behandelt, so verschwand die diffuse Vakuolenfärbung völlig, doch die kleinen violetten Entmischungströpfchen blieben gefärbt.

Bei einem Versuch mit Neutralrot $p_H = 7{,}1$ in der Konzentration 1 : 10.000 waren die Zellsäfte diffus hellrosa (ga 8) gefärbt. Die Zellen wurden mit n/100 NH_3 behandelt. Die Diffusfärbung verschwand, gleichzeitig fielen aber in einigen Zellen kleine Kristalle (Dentriten) aus. Bei zweimaliger Wiederholung des Versuches erhielt ich gleiche Bilder.

Im sauren Bereich ($p_H = 4{,}6$) erschien die Zellmembran mit Neutralrot rosa (ia 8) gefärbt. Bei einer 15 Minuten langen Färbung war neben der Zellwandfärbung auch hellrote Vakuolenfärbung zu sehen. Es ist aber möglich, daß der Farbstoff erst nachträglich von der Zellwand in das Zellinnere eingedrungen ist.

Wurden die Zellen mit Methylenblau 1 : 10.000 im alkalischen Bereich gefärbt, so waren die Querwände dunkelviolett und der Zellsaft zumeist diffus violett (la 11). Bei $p_H = 11{,}6$ zeigten die Querwände ein dunkles Blauviolett, auch die Längswände waren leicht violett tingiert. Der Zellsaft erschien diffus hellviolett, während in der Nähe der Chromatophoren eine Blaufärbung zu erkennen war.

Mit Toluidinblau (1 : 10.000) hingegen sah ich stets violette Diffusfärbung der Vakuolen von *Gymnozyga*. In einzelnen Zellen waren violette Tröpfchen sichtbar, die auch nach Behandlung mit NH_3 erhalten blieben, während die Diffusfärbung stets nach längerer Einwirkungsdauer völlig verschwand.

Eine blaue Zellwandfärbung wurde mit Toluidinblau $p_H = 7{,}5$ erzielt, während die Zwischenzellwände violett waren. Die Zellsäfte haben den Farbstoff nicht angereichert. Bei $p_H = 10{,}5$ erschien eine violette Diffusfärbung des Zellsaftes, die Querwände waren violett gefärbt, die Längswände fast farblos. — Mit diesem Farbstoff ließen sich keine Unterschiede gegenüber anderen „leeren" Zellsäften erkennen.

Der Farbstoff Brillantcresylblau rief bei *Gymnozyga* im sauren Bereich blaue (nc 14) Zellwandfärbung hervor. Im Alkalischen waren die Zellsäfte violett (la 12) diffus gefärbt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß *Gymnozyga Breb.* „leere" Zellsäfte besitzt, doch weisen einzelne Versuchsergebnisse darauf hin, daß dennoch in den Zellen speicherfähige Stoffe enthalten sein müssen.

Interessant ist ferner, daß Toluidinblau die Längswände der Zellen blau, die Querwände violett färbte, wogegen mit Methylenblau die Längswände violett und die Querwände blau gefärbt waren.

4. *Oedogonium* sp.

Bei Vitalfärbung mit verschiedenen Farbstoffen verhalten sich die Zellen im allgemeinen wie „leere" Zellsäfte (vgl. Höfler 1954, Höfler u. Schindler 1955). Dennoch treten mitunter Zweifel auf.

Mit Methylenblau (1 : 10.000, $p_H = 11{,}0$) gefärbt, erhält man blaue und violette Vakuolenfärbung (Abb. 12). Auch mit Brillantcresylblau habe ich einige Male neben der violetten Zellsaftfärbung kleine blaue Tröpfchen beobachten können, die sich mit n/100 NH_3 nicht entfärbten, während die Diffusfärbung nach kurzer Zeit völlig verschwunden war.

Neutralrot 1 : 10.000, in Wiener Leitungswasser ($p_H = 7{,}8$) gelöst, ergab eine diffuse hellrosa (ia 8) Zellsaftfärbung, nach 5 bis 15 Minuten waren einige kontrahierte erdbeerrote (la 6) Teilvakuolen in den Zellen sichtbar. Kleinere rote Tröpfchen, die in starker BMB waren, schlossen sich zu größeren Entmischungstropfen zusammen. Die Membran war ungefärbt. — Bei $p_H = 6{,}8$ war die Zellwand nur schwach rosa tingiert, die Zellsäfte erschienen zuerst ungefärbt, zeigten langsame rosa Diffusfärbung, hernach war Tröpfchenfällung zu erkennen, in anderen Zellen waren mehrere rote Teilvakuolen. Mit n/100 NH_3 entfärbten sich die Zellen erst nach längerer Einwirkungsdauer (nach $^1/_2$ Stunde noch nicht entfärbt) allmählich ganz.

Bei $p_H = 4{,}6$ war rosa (ia 8) Zellwandfärbung, der Zellsaft war farblos.

Wiederholt habe ich bei diesen Versuchen beobachtet, daß der Farbstoff bei kleineren (schmäleren) Formen viel schneller wirksam wird und es viel schneller zur Vakuolenfärbung und -kontraktion kommt als bei breiteren Formen. In einem Präparat lagen eine großzellige Form und ein Faden einer Art mit sehr kleinen Zellen dicht beisammen. Der Unterschied war hier deutlich zu sehen. Ob

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

dies nur für einzelne Arten kennzeichnend ist oder aber wirklich von der Größe der Zellen abhängt, ist nicht geklärt.

Wurden die Zellen von *Oedogonium* mit Rhodamin B gefärbt und im Hellfeld betrachtet, so zeigten die Zellen keine Farbstoffanreicherung.

Mit den beiden blauen Farbstoffen Toluidinblau und Brillantcresylblau in der Konzentration 1 10.000 war im alkalischen Bereich stets violette (la 12) Vakuolenfärbung zu beobachten, die bei Toluidinblau bis p_H 10,5, bei Brillanteresylblau bis p_H 8,2 herunterreicht. Im sauren p_H-Bereich waren die Zellwände blau gefärbt. Bei Färbung mit Methylenblau 1 10.000 im alkalischen Bereich ($p_H = 11,6$) zeigten sich oft eigenartige Bilder. Bei ein und derselben Art erschienen im gleichen Präparat violett und kobaltblau gefärbte Vakuolen, die zuweilen leicht kontrahiert waren. Die Zellen ließen sich mit 0,8 mol TRZ alle normal plasmolysieren. Meist jedoch erschienen die Vakuolen blau (ne 15) gefärbt, nebst kleinen hellblauen Tröpfchen, die in BMB tanzten. Nicht immer war die Entfärbung mit n/100 NH_3 vollständig, oft blieben kleine runde rote Tröpfchen zurück, die sich auch nach längerer Einwirkung nicht entfärbten (Abb. 11).

Im Winter 1953/54 wurde zu diesen Versuchen zum Teil Material von Tamsweg vom August 1952 verwendet, das sich im Kaltwasserbecken des Pflanzenphysiologischen Instituts gehalten hat. Es muß etwas verändert gewesen sein, denn es zeigten sich in den Zellen der *Oedogonium* gelbe bis orangerote Abbaustoffe in Form von großen Kugeln (meist zwei in einer Zelle). Da die Zellen aber völlig normal plasmolysierbar waren, dürfte es sich um „winterlich veränderte Zellen" gehandelt haben. Mit Sudan III konnte ihre Fettnatur nachgewiesen werden. Es wurden hierzu unter dem Deckglas die Zellen leicht mechanisch geschädigt und die gelben Körper durch sanftes Drücken auf das Deckglas aus den Zellen herausgedrückt. Sie rundeten sich im Wasser sofort wieder ab. So war es möglich, sie mit Sudan III zu färben, welches ja in die Zellen nicht eindringen kann. — Ähnliche Speicherstoffe sind aus anderen Zellen bekannt, so z. B. von Netrien (vgl. Kopetzky-Rechtperg 1955).

Bei Färbung mit Toluidinblau oder Brillantcresylblau erhielt ich zum Teil merkwürdige Bilder. Während mit Toluidinblau die gelben Körper unfärbbar waren und nur der Zellsaft eine violette Diffusfärbung zeigte, erschienen erstere mit Brillantcresylblau gefärbt. In ein und demselben Präparat, ja selbst in gleichen Zellfäden, zeigten sie verschiedene Farben (Abb. 9, 10). Brillantcresylblau, 1 : 10.000, p_H 12,2, drang sofort ein und gab violette Färbung.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

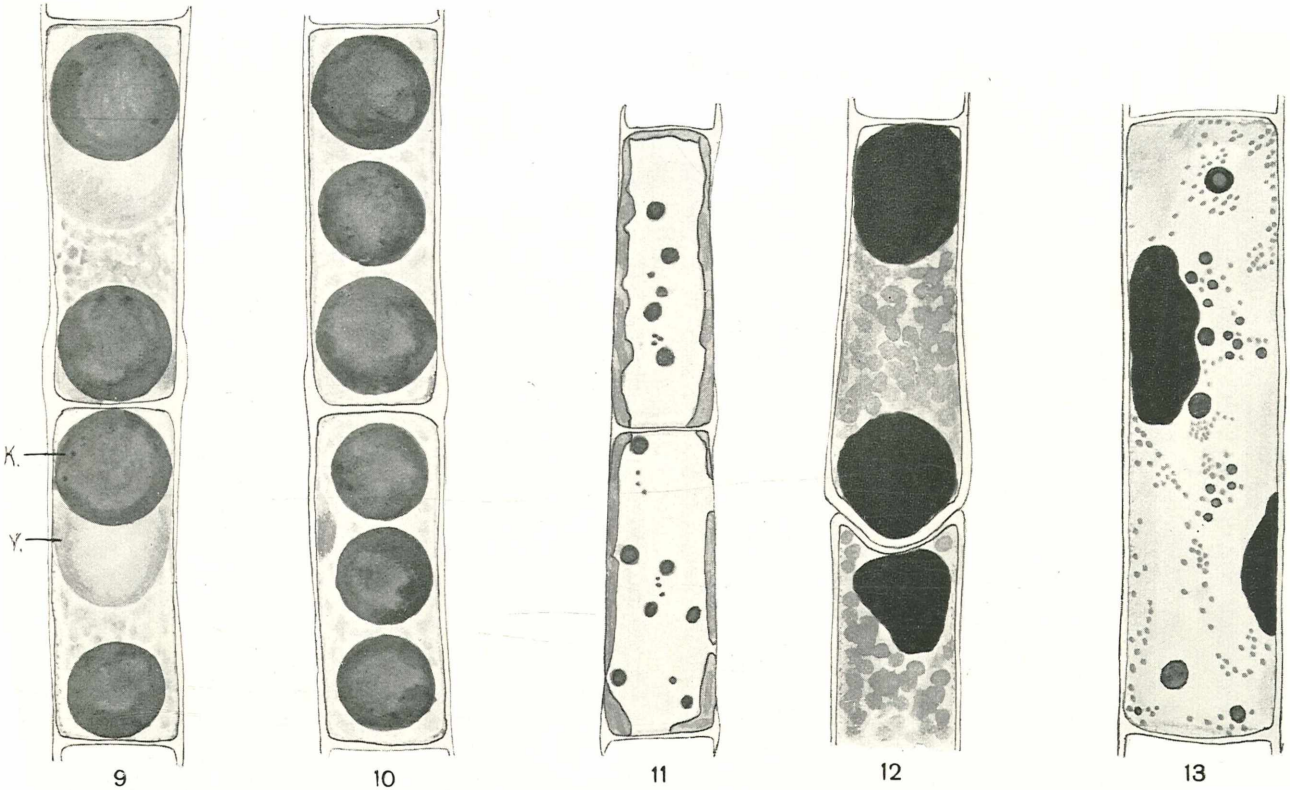


Abb. 9. *Oedogonium* sp. Gefärbt mit Brillantcresylblau 1 : 10.000, p_H 12,2, 5 Minuten. In den Zellen große gelbe Fettkörper, die blau gefärbt sind, violette Vakuolenfärbung. K.: Fettkörper, V.: Vakuole. — Abb. 10. Der gleiche Faden einige Zellen weiter. Die Fettkörper sind orange und rot gefärbt. — Abb. 11. *Oedogonium* sp., mit Methylenblau 1 : 10.000, p_H 11,0, 5 Minuten gefärbt, dann mit n/100 NH_3 entfärbt. Kleine rote Tröpfchen lassen sich nicht entfärben. — Abb. 12. *Oedogonium* sp. Gleiche Färbung. Starke blaue Vakuolenfärbung. — Abb. 13. *Mougeotia* sp., mit Methylenblau 1 : 10.000, p_H 11,6, 10 Minuten gefärbt. Dunkelblaue Vakuolen, lichtblaue Tröpfchen, grünblaue Gerbstoffällung.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

In den Zellen lagen große gelbliche „Kugeln", diese erschienen nach der Färbung in verschiedenen Farben: orange (pa 5), gelb (la 2), blau (pe 15), hellorange (ga 3), rot (na 7). Die Teilvakuolen waren (la 12) violett gefärbt. Die Zellen ließen sich mit 1 mol KCl normal plasmolysieren.

Mit Methylenblau, Toluidinblau, Rhodamin B und Neutralrot färbten sich in meinen Versuchen die Fettkörper nicht an, nur mit Brillantcresylblau zeigten sich die verschiedenen Färbungen.

5. *Mougeotia* sp.

Mougeotia, die zu den fadenartigen *Zygnemataceae* gehört, ist ein beliebtes Versuchsobjekt (Cholnoky 1937, Höfler u. Schindler 1955).

Ob *Mougeotia* „vollen" oder „leeren" Zellsaft besitzt, ist schwer zu entscheiden, da die Versuchsergebnisse mit den einzelnen Farbstoffen oft weitgehend verschieden sind.

Wurden die Zellen mit Neutralrot gefärbt, das in Leitungswasser ($p_H = 7{,}8$) gelöst war und in der Konzentration 1 : 10.000 vorlag, so erschienen die Zellen dunkelviolett (nc 10) gefärbt. Diese Färbung beschränkte sich aber auf die Gerbstoffbläschen, von denen die Zellen dicht erfüllt sind. Im Zellsaft tanzten winzige violette Tröpfchen in starker BMB. Bei hohem p_H (= 9,5—10,1), in der Konzentration 1 : 100.000, war rote Diffusfärbung des Zellsaftes zu erkennen. Bei Färbung mit Neutralrot ($p_H = 7{,}5$) konnte ich einige Male Wabenvakuolen erkennen (vgl. Gicklhorn u. Möschl 1929, Kiermayer 1954).

Ein Parallelversuch mit *Mougeotia* und *Spirogyra*, auf die Neutralrot einen stark schädigenden Einfluß ausübte (vgl. Huber 1955), zeigte, daß *Mougeotia* nur sehr langsam durch diesen Farbstoff geschädigt wird. Die Zellen wurden mit Neutralrot, 1 : 10.000, in Leitungswasser gelöst, 10 Minuten lang gefärbt und dann in Leitungswasser belassen. Bei mehrmaligen Beobachtungen im Mikroskop zeigte sich, daß die Zellen noch kaum geschädigt waren. Viele kleine violette Tröpfchen waren in BMB, violette, stark kontrahierte Teilvakuolen waren neben den zahlreichen, etwas dunkler gefärbten Gerbstoffbläschen zu sehen. Noch nach drei Tagen waren die Zellen normal mit 0,8 mol TRZ zu plasmolysieren.

Mit Rhodamin B (1 : 5000) zeigten die Zellen, im Hellfeld beobachtet, öfters eine schwache violette (ia 10) Diffusfärbung des Zellsaftraumes. Die Gerbstoffbläschen waren lila (pa 11). Eine schwache hellviolette Diffusfärbung des Plasmas war öfters zu sehen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Brillantcresylblau ergab bei Vitalfärbung (1 : 10.000, p_H = 11,6) von *Mougeotia*-Zellen blaugrüne (na 16) Gerbstoffbläschen, dunkelblaue Teilvakuolen und violette Tröpfchen, die in BMB waren. Der Zellsaft war diffus violett gefärbt (Abb. 13). Die Färbung verschwand mit n/100 NH_3 sofort.

Das Verhalten gegenüber Brillantcresylblau spricht also für einen „vollen" Zellsaft. Um dies nochmals zu überprüfen, beobachtete ich den zeitlichen Verlauf der Färbung. Der Farbstoff drang ein und färbte sofort die Gerbstoffbläschen hellblau. Der Zellsaft zeigte eine diffuse violette Färbung. Im weiteren schlossen sich die kleinen violetten Tröpfchen, die in BMB waren, zu größeren violetten Entmischungstropfen zusammen. Nach ungefähr 5 bis 10 Minuten schlug der violette Farbton zu Blau um, das dem gleichen Farbton entsprach, den Zellen mit vollen Zellsäften nach Brillantcresylblaufärbung zeigen. Mit n/100 NH_3 verschwand die violette Färbung völlig, nur Zellen mit blauen Tröpfchen entfärbten sich nicht. Bei darauffolgender Plasmolyse zeigte sich, daß sich nur die entfärbten Zellen konvex abrundeten, während die anderen Zellen unplasmolysierbar waren. Aus diesem Versuch kann man schließen, daß die Blaufärbung wohl bei mehr oder minder nekrotischen Zellen auftritt. Es wäre möglich, daß bei geringer Schädigung Stoffe aus dem Protoplasma in den Zellsaft ausfallen und ihn zu einem „vollen" Zellsaft umgestalten. Auch bei *Oedogonium* konnte ich einen solchen Farbumschlag während der Färbung mit Brillantcresylblau beobachten.

Toluidinblau wurde von den Zellsäften mit violettem Farbton diffus gespeichert. Es war in der gleichen Konzentration bei p_H = 11,0 in Anwendung gebracht worden.

Wurden die Zellen mit Methylenblau gefärbt, so zeigte sich zuerst eine lichtblaue Diffusfärbung des Zellsaftes. Wurde der Farbstoff etwas stärker gespeichert, erschienen die Vakuolen meist dunkelblau gefärbt. Die Gerbstoffbläschen reicherten den Farbstoff mit hellblauer bis blaugrüner Farbe an. Zuweilen waren die Zellen aber auch diffus violett gefärbt.

Zusammenfassung.

Seit Höfler (1946—1949 b) die grundlegende Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte durch die Ergebnisse bei Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen getroffen hat, wurden zahlreiche Versuche mit verschiedenen Farbstoffen an Objekten angestellt, die in ihrem Vitalfärbeverhalten noch nicht bekannt waren. Solche Vitalfärbestudien wurden sowohl bei höheren Pflan-

zen als auch bei Algen mit Erfolg durchgeführt. Es hat sich gezeigt, daß bei Gewebszellen höherer Pflanzen (vgl. Flasch 1955) die leeren Zellsäfte, die nach Akridinorangefärbung rot fluoreszieren, relativ selten sind. Bei Süßwasseralgen jedoch überwiegen die leeren Zellsäfte, und nur wenige Arten fluoreszieren nach Behandlung mit Akridinorange grün — haben also volle Zellsäfte. So besitzen alle bisher untersuchten Spirogyren volle Zellsäfte, weiters *Netrium digitus*, *Cylindrocystis Brebissonii* und *Micrasterias fimbriata*. Diese Objekte vermögen also Rhodamin B diffus zu speichern, erscheinen mit Toluidinblau, Brillantcresylblau und Methylenblau hellblau bis blaugrün gefärbt. Der Farbstoff Neutralrot wird mit violetter Farbe angereichert, welche vollen Zellsäften entspricht.

Die Bezeichnung „voll" und „leer" bezieht sich nur auf die Diffusfärbung der Zellsäfte (Höfler und Schindler 1955). Leere Zellsäfte speichern den Farbstoff Neutralrot mit gelbroter bis erdbeerroter Farbe, Toluidinblau färbt die Vakuolen stets diffus violett. Bei Färbung mit Methylenblau und Brillantcresylblau wurden die Zellsäfte entweder violett oder kobaltblau gefärbt. Leere Zellsäfte vermögen Rhodamin B nicht zu speichern.

Im allgemeinen ist die Unterscheidung zwischen vollen und leeren Zellsäften leicht zu treffen. Jedoch zeigten einige Objekte nach Behandlung mit den verschiedenen Farbstoffen abweichendes Verhalten. So ist z. B. nicht klar zu entscheiden, ob *Zygogonium* sp. volle Zellsäfte besitzt, da ich mit Rhodamin B keine Farbstoffspeicherung im Zellsaft erzielen konnte.

Hyalotheca zeigte bei Färbung mit Methylenblau und Brillantcresylblau Farbtöne, die vollen Zellsäften entsprechen. Mit anderen Farbstoffen erschienen die Farbtöne der leeren Zellsäfte.

Auch *Gymnozyga Brebissonii* ließ sich nicht eindeutig bestimmen. Bei Färbung zeigte sie stets den für leere Zellsäfte charakteristischen Farbton, wurde sie jedoch mit n/100 NH_3 behandelt, so blieben meist kleine Tröpfchen zurück, die sich auch nach längerer Einwirkungsdauer nicht entfärben ließen.

Ähnliches Verhalten zeigte auch *Oedogonium*. Oft war in ein und demselben Faden nach Färbung mit Methylenblau im alkalischen Bereich blaue und violette Vakuolenfärbung zu erkennen. Rhodamin B wird von den Zellen nicht gespeichert. In „winterlich veränderten" Zellen traten oft gelbliche Fettkörper in Erscheinung, die sich mit Brillantcresylblau in den verschiedensten Farbtönen anfärbten.

Die gerbstoffhaltigen Zellen von *Mougeotia* sp. sind besonders interessant. Diese Zellen verhalten sich gegenüber den ver-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

schiedenen Farbstoffen wie leere Zellsäfte, bisweilen wird aber Rhodamin B mit violettem Farbton gespeichert (vgl. S. 937). Bei Färbung mit Brillantcresylblau erscheinen die Zellen diffus violett gefärbt. Nach kurzer Zeit jedoch schlägt der Farbton nach Blau um. Diese Zellen ließen sich dann mit Ammoniak nicht entfärben. Ich konnte wahrscheinlich machen, daß nach geringer Schädigung Stoffe des Protoplasmas in den Zellsaft entweichen und ihn als voll erscheinen lassen.

Starke Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung ist vor allem bei Objekten mit leeren Zellsäften zu beobachten.

Die Färbeschwelle liegt bei vollen Zellsäften, je nach der Art des Farbstoffes, im schwach sauren bzw. neutralen bis schwach alkalischen Gebiet der p_H-Skala, bei leeren Zellsäften hingegen ist sie stets nach dem alkalischen Teil der p_H-Skala hin verschoben. So zeigte sich ferner bei Untersuchungen an leeren Zellsäften, daß die Lage der Färbeschwelle von der Färbezeit abhängig ist. Bei lange dauernder Färbung verschiebt sie sich nach dem sauren Bereich hin. Dies hat Kinzel (1954) bereits erwartet, da ja der Gehalt an permeierfähigen Farbbasenmolekülen mit fallendem p_H-Wert der Farblösung abnimmt und daher das Speicherungsgleichgewicht sich immer langsamer einstellt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß die Zellen auch dann, wenn in der Farblösung kaum Farbbasenmoleküle vorhanden sind, Anteile des in der Zellwand in hoher Konzentration angereicherten Farbstoffes langsam aufnehmen können (vgl. Höfler u. Schindler 1953 und Hirn 1953). Bei *Eremosphaera* zeigte sich allerdings derselbe Effekt ohne gleichzeitige Membranfärbung.

Literaturverzeichnis.

Becker, W. A., 1936: Vitale Cytoplasma-Kernfärbungen (Sammelreferat). Protoplasma 26, 439.

Borriss, H., 1938: Die Abhängigkeit der Aufnahme und Speicherung basischer Farbstoffe durch Pflanzenzellen von inneren und äußeren Faktoren. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 55, 584.

Cholnoky, B. v., 1934: Plasmolyse und Lebendfärbung von *Melosira*. Protoplasma 22, 161.

— 1937: Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. Math. u. naturw. Anzeiger d. ung. Akad. d. Wiss., Bd. 56, 944.

Cholnoky, B. v. und Höfler, K., 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., I. Abt., 159, 143.

Czaja, A. Th., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. II. Basische Farbstoffe. Planta 21, 531.

— 1937: Untersuchungen über die Farbstoffaufnahme in die lebende pflanzliche Zelle. Planta 26, 90.

Dangeard, P. A., 1916: Nouvelles recherches sur le système vacuolaire. Bull. soc. Bot. Fr. 73.
— 1916: Note sur les corpuscules metachromatiques des Levures, Bull. Soc. Mycol. Fr. 32, 27.
Dangeard, P., 1947: Cytologie végétale et cytologie générale. Paris.
Döring, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. Ges. 35, 415.
Drawert, H., 1937 b: Der Einfluß anorganischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 55, 380.
— 1938 b: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 56, 123.
— 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. Planta 29, 376.
— 1940: II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
— 1948: Desgl. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Farbstoffe, Zschr. f. Naturforschung 3 b, 111.
— 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma 40, 85.
Drawert, H. u. Strugger, S., 1938: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen. I. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 56, 43.
Flasch, A., 1955: Die Festigkeit der Farbstoffbindungen in vitalgefärbten Pflanzenzellen (im Druck).
Fritz, A., 1951: Veränderungen von Plasmaeigenschaften durch Vitalfarbstoffe. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., I. Abt., 160, 729.
Gicklhorn, J., 1929: Beobachtungen über vitale Farbstoffspeicherung, Kolloidchem. Beih. 28, 367.
Gicklhorn, J. u. Weber, F., 1927: Über Vakuolenkontraktion und Plasmolyseform. Protoplasma 28, 528.
Guilliermond, A., 1930: Sur la toxicité des colorants vitaux. Extrait des Comptes rendus des séances de la Société de biologie. Séance 1930. Tome CIV, page 468.
— 1927: Sur l'action du Rouge Neutre sur les Cellules Végétales et sur la Coloration du Vacuome. Bull. d'Histol. appl. IV/4 (Labor. Botanique, Fac. des Sciences de Paris).
Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller" Zellsäfte. Protoplasma 40, 338.
Hirn, I., 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. Flora 140, 453.
— 1953: Vitalfärbung von Diatomeen mit basischen Farbstoffen. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 162, 571.
Höfler, K., 1943: Über Fettspeicherung und Zuckerpermeabilität einiger Diatomeen usw. Protoplasma 38, 71.
— 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
— 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., I. Abt., 156, 585.
— 1949 a: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis 19, 90.
— 1949 b: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. 1. Sonderb. der Zschr. Mikrosk. 46.
— 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen, Protoplasma 40, 426.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Höfler, K., 1953: Zur Frage des Plasmalemmas bei Spirogyra. Protoplasma 42, 336.
Höfler, K. u. Schindler, H., 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Protoplasma 40, 137.
— 1952: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Österr. Bot. Zschr., Bd. 99, 529.
— 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. Protoplasma, Bd. 42, 296.
— 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. Protoplasma 45, 173.
Hofmeister, L., 1938: Studien über die Permeabilität vital gefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 55, 393.
Irwin, M., 1923: The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. Journ. Gen. Physical. 5, 727.
— 1926: Mechanism of the accumulation of dye in Nitella on the basis of the entrance of the dye as undissociates moleculs. Journ. gen. Physiol. (Am.) 9, 561.
Johannes, H., 1941: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmyzelien. II. Die Inturbanz der Färbung mit Rhodaminen. Protoplasma 36, 181.
Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 163, 175.
— 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl. (im Druck).
Kinzel, H., 1953: p_H-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. Protoplasma 43, 441.
— 1953: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Österr. Bot. Zschr. 100, 26.
— 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma 44, 52.
Kopetzky-Rechtperg, O., 1951: Über eine Mißbildung der Algen Netrium digitus. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 160, 573.
— 1955: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge Netrium digitus (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß. Protoplasma XLIV.
Küster, E., 1942: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion. Zeitschr. wiss. Mikroskopie 58, 78.
— 1951: Die Pflanzenzelle, Jena. 9508 ff.
Loub, W., 1951: Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, Bd. 160, 829.
Overton, E., 1895: Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. V. J. Schr. Naturf. Ges. Zürich 40, 159.
— Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. Ebenda 44, 88.
Ostwald, W.: Die Kleinen Farbmeßtafeln nach Ostwald, Ausgabe C. Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart-O.
Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2, 179.
Rohde, K., 1947: Untersuchungen über den Einfluß der freien H-Ionen im Inneren lebender Zellen auf den Vorgang der vitalen Färbung. Pflüger's Archiv 168, 411.
Strugger, S., 1935: Beiträge zur Gewebsphysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 24, 331.

Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56.
— 1940 a: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 73, 97.
— 1940 b: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 34, 601.
— 1949: Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze. Berlin.
West, W. and G. S., 1904—1922: A Monographie of the British Desmidiaceae. Vol. I—V, London.
Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von Allium-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma 40, 405.